

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## ACTION DE CERTAINES TEMPÉRATURES SUR LA CONSERVATION DE L'ACTIVITÉ DU VIRUS FIXE DE PASTEUR

par VICTOR GRYZEZ.

(*Institut Pasteur de Lille.*)

En 1933, nous avons signalé avec H. Marneffe (1) que le virus fixe de Pasteur, entretenu à Lille depuis 1893, s'était modifié à la suite de 1.800 passages pendant ces quarante années dans le sens d'une augmentation de sa virulence pour le lapin. La durée de l'incubation, après inoculation intracérébrale, était passée de six à cinq et parfois quatre jours.

Nous avons pu rendre à ce virus son activité normale en n'utilisant pour les passages que des cerveaux conservés à une température de 23° pendant vingt jours au moins dans de la glycérine pure à 30°. En utilisant cette technique, nous avons enregistré, de juillet 1933 à mars 1936, pour 38 lapins inoculés, 33 incubations normales, soit 86 p. 100.

(1) V. GRYZEZ et H. MARNEFFE. Ces *Annales*, 55, p. 151.

Des modifications apportées aux locaux de notre service antirabique ont rendu inutilisable en mars 1936, pendant un certain temps, l'étuve à 23°. Les cerveaux ont été momentanément entreposés dans une glacière réglée à 4°.

Rien d'anormal ne fut d'abord remarqué dans l'activité du virus ainsi conservé au froid, mais bientôt des incubations écourtées furent observées puis se multiplièrent de telle sorte que du 16 mars au 15 juillet 1936, il n'a plus été relevé que 57 p. 100 d'incubations normales au lieu de 86 p. 100 chez les lapins inoculés avec des cerveaux ayant séjourné au moins vingt jours en glycérine. La résistance du virus de Lille à l'action de la glycérine semblait donc avoir été augmentée par le fait de sa conservation au froid. Des constatations analogues ont été faites par Remlinger et Bailly qui signalent, dans une note à la Société de Biologie, l'action conservatrice du froid sur la virulence des cerveaux rabiques glycerinés placés à + 6° (2).

Du reste, le retour à la conservation à 23° de notre virus a confirmé le bien-fondé de cette interprétation : dès que l'étuve réglée à 23° a pu être utilisée à nouveau, il a été constaté que, très rapidement, la virulence du virus était redevenue normale, c'est-à-dire avec des incubations de six jours chez les lapins de passage.

La constatation qui avait été faite d'une diminution dans l'atténuation de la virulence des cerveaux conservés au froid, devait conduire à rechercher si le même phénomène se produirait pour les moelles glycerinées. Cette recherche aurait, en effet, une conséquence pratique pour la conduite du traitement tel qu'il est fait à Lille. Celui-ci consiste à injecter aux personnes mordues, d'abord des moelles conservées en glycérine seize à vingt-quatre jours à 23°. A la suite d'expériences déjà anciennes, ces moelles sont considérées comme peu virulentes; on injecte ensuite des moelles conservées seulement huit à quinze jours dont la virulence semble très peu modifiée.

Si les moelles conservées à basse température en glycérine pendant seize à vingt-quatre jours gardaient leur virulence

(2) REMLINGER et BAILLY. *C. R. Société de Biologie*, **116**, 1934, p. 407.



d'origine, la progression dans l'activité du virus-vaccin injecté au cours du traitement ne pourrait plus être respectée et il deviendrait nécessaire de modifier le choix ou le mode d'atténuation des moelles.

L'expérience suivante a été faite dans le but de préciser l'action du froid sur la conservation de la virulence des moelles glycinées. Trois séries de moelles desséchées deux jours sur potasse ont été plongées dans de la glycérine pure à 30°, puis conservées respectivement aux températures de - 10°, + 4° et + 23°. Avec ces moelles, des inoculations ont été pratiquées à des lapins sous la dure-mère après des périodes de conservation de un à vingt-quatre jours. Le tableau suivant indique les résultats de cette expérience.

Moelles desséchées deux jours puis conservées en glycérine à 30°.

DURÉE de la conservation en jours	CONSERVATION à - 10°			CONSERVATION à + 4°			CONSERVATION à + 23°		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	Nombre de lapins inoculés	Nombre de résultats positifs	Incubation en jours	Nombre de lapins inoculés	Nombre de résultats positifs	Incubation en jours	Nombre de lapins inoculés	Nombre de résultats positifs	Incubation en jours
1 à 8 . . . . .	8	8	6 à 7	8	8	6 à 8	8	8	6 à 8
9 . . . . .	1	1	7	4	1	6	4	1	7
10 . . . . .	1	1	6	4	1	6	1	1	6
11 . . . . .	1	1	6	2	1	7	2	1	8
12 . . . . .	1	1	6	1	1	7	3	1	6
13 . . . . .	1	1	6	1	1	7	3	0	
14 . . . . .	2	1	7	2	1	7	2	1	8
15 . . . . .	2	1	7	2	1	6	3	0	
16 . . . . .	1	1	7	1	1	12	3	0	
17 . . . . .	2	1	13	1	1	6	3	0	
18 . . . . .	1	1	7	1	1	7	2	0	
19 . . . . .	3	1	7	1	1	9	2	0	
20 . . . . .	1	1	8	2	1	7	1	1	7
21 . . . . .	1	1	12	2	0	»	2	0	
22 . . . . .	1	1	6	1	1	7	2	0	
23 . . . . .	1	1	7	1	1	6	2	0	
24 . . . . .	1	1	6	2	1	6	2	0	

L'examen de ce tableau permet de faire certaines constatations qui peuvent être résumées de la façon suivante :

	NOMBRE de jours de conservation		POURCENTAGE de succès	DURÉE de l'incubation en jours
1 à 8	{	Conservation à — 10° . . . . .	100	6 à 5
		Conservation à + 4° . . . . .	100	7
		Conservation à + 23° . . . . .	100	7

(Résultats identiques.)

9 à 16	{	Conservation à — 10° . . . . .	80	6 à 5
		Conservation à + 4° . . . . .	47	7 à 2
		Conservation à + 23° . . . . .	27	7

L'action du froid est ici beaucoup plus marquée, portant plutôt sur la quantité de virus, semble-t-il, que sur sa qualité puisque l'incubation est à peu près la même avec des pourcentages de succès variant de 80 p. 100 à 27 p. 100.

17 à 24	{	Conservation à — 10° . . . . .	72	8 à 2
		Conservation à + 4° . . . . .	70	7 à 5
		Conservation a + 23° . . . . .	5	7

L'action d'une température relativement élevée (+23°) est particulièrement visible puisqu'elle réduit à 5 p. 100 seulement le nombre des succès. La qualité du virus ne semble pas très modifiée.

Il ressort de ces expériences :

1° Le virus fixe de Pasteur continue, à Lille, à se modifier. Les moelles conservées à 23° résistent moins qu'autrefois à l'action de la glycérine ;

2° Les moelles, après un séjour de seize à vingt-cinq jours à une température de 23° dans la glycérine, sont complètement avirulentes et ne répondent plus aux conditions fixées pour le début d'un traitement qui exige, au début, l'injection de moelles de virulences seulement amoindries ;

3° Ces moelles conservées neuf à seize jours à 23° dans la glycérine, sont également diminuées dans leur activité et ne peuvent plus être considérées comme des moelles de virulence normale, qui doivent, dans la progression du traitement, succéder aux moelles à virulences diminuées du début.

Si l'on veut continuer à appliquer aux personnes mordues le traitement qui a été employé jusqu'ici, on est donc amené à adopter une des techniques suivantes :

a) Faire la conservation des moelles glycerinées à 23°. Com-

mencer le traitement par des moelles conservées neuf à seize jours (qui sont virulentes dans 27 p. 100 des cas); le continuer par celles conservées un à huit jours (virulentes dans 100 p. 100 des cas) ;

b) Commencer le traitement par des moelles conservées dix-sept à vingt-quatre jours à  $+4^{\circ}$  (virulentes dans 70 p. 100 des cas), le continuer par des moelles conservées à  $+4^{\circ}$  un à huit jours (virulentes dans 100 p. 100 des cas) ;

c) Commencer le traitement par des moelles conservées à  $23^{\circ}$  pendant neuf à seize jours (virulentes dans 27 p. 100 des cas), pratiquer avec ces moelles les huit premières inoculations ; employer pour les neuvième, dixième, onzième et douzième inoculations des moelles conservées à  $-10^{\circ}$  pendant neuf à seize jours (virulentes dans 80 p. 100 des cas), et pour les deux dernières inoculations du traitement ordinaire de quatorze jours, des moelles conservées un à huit jours à  $-10^{\circ}$  (virulentes dans 100 p. 100 des cas).

Le traitement des personnes atteintes de blessures graves comporterait une série de huit injections de moelles conservées neuf à seize jours à  $23^{\circ}$  ; toutes les autres inoculations jusqu'au vingt-quatrième jour seraient faites avec des moelles conservées huit jours au plus à  $-10^{\circ}$ .

C'est cette dernière façon de procéder que nous préconisons volontiers.



**TENTATIVES D'IMMUNISATION  
PAR LA VOIE INTRADERMIQUE  
CONTRE UN SARCOME EHRLICH DE LA SOURIS**

par A. BESSEMAN et L. ASAERT.

(*Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université  
de l'Etat, à Gand. Directeur : Prof. D<sup>r</sup> A. BESSEMAN.*)

[TROISIÈME NOTE (1)]

Dans une série de publications [1 à 6], Besredka et Gross relatent qu'il leur fut possible de créer chez la souris blanche une immunité solide et spécifique vis-à-vis du sarcome Ehrlich de la souris inoculé dans la peau, sous la peau ou dans le péritoine, notamment en inoculant *par la voie intracutanée*, trois à quatre semaines plus tôt, une dose de la même tumeur capable de disparaître au bout de cette période. Ils rapprochent ces résultats de leurs observations relatives à l'immunité locale dans le charbon bactérien, et se demandent si « ces analogies entre les virus connus et les tumeurs malignes ne doivent pas orienter nos recherches sur le néoplasme plutôt dans le sens de l'infection que dans celui de la greffe ».

Disposant, grâce à l'amabilité de Besredka, du sarcome qui servit aux essais précités, et ayant vérifié les caractères principaux de ce néoplasme [7 et 8], nous avons institué à notre tour des essais d'immunisation, en nous rapprochant le plus possible des conditions expérimentales de nos prédécesseurs.

Nous avons découpé, au scalpel, en petits fragments, puis trituré dans 20 cent. cubes d'eau physiologique, la coque charnue entière de sarcomes frais de la grosseur d'une cerise,

(1) Dans notre deuxième note (*Ces Annales*, 57, n° 6, décembre 1936, p. 633, 6<sup>e</sup> ligne, au lieu de « 0 gr. 20 », il faut lire : « 0 gr. 25 ».

jusqu'à l'obtention d'*émulsions homogènes* capables d'être aspirées aisément à travers une aiguille de 0 mm. 2 de diamètre intérieur ; et nous avons commencé par administrer de telles émulsions à 190 souris, à raison de 0 c. c. 3, 0 c. c. 2, 0 c. c. 1 ou 0 c. c. 05 par animal, en injection intradermique ou sous-cutanée.

Chez un premier lot de 40 animaux ayant reçu soit 0 c. c. 3 dans la peau (10 souris) ou sous la peau (10 souris), soit 0 c. c. 2 dans la peau (10 souris) ou sous la peau (10 souris), il se développa, sans exception, au bout d'une quinzaine de jours, une tumeur de la grosseur d'un petit pois, qui continua de croître rapidement et entraîna la mort un mois environ après l'inoculation. L'évolution des tumeurs, ainsi produites par injections sous-cutanées, fut en tous points semblable à celle des sarcomes que nous avons décrits ailleurs comme consécutifs à l'introduction, par la même voie, de *bouillie pure* de coque tumorale [7]. En cas d'injection intradermique, par contre, de l'émulsion précitée, la peau montra d'abord, au niveau de l'inoculation, notamment depuis le deuxième ou troisième jusqu'au quinzième jour environ après celle-ci, une légère desquamation ; ensuite, elle se tendit progressivement, rouge et brillante, sur une tuméfaction fortement indurée, qui faisait corps avec elle, mais roulait, indépendante, sur les plans sous-jacents, et atteignait au moment de la mort, un mois à six semaines après l'inoculation, jusqu'aux dimensions d'une grosse noix de galle d'un poids de 9 grammes.

Chez un deuxième lot de 150 souris, dont 120 reçurent, par moitié, chacune 0 c. c. 1 d'émulsion, les unes dans la peau et les autres sous la peau, et dont 30 autres furent traitées de même, aussi par moitié, à raison de 0 c. c. 05 par animal, trois groupes réactionnels se dessinèrent comportant 73, 38 et 39 animaux chacun, répartis suivant les indications du tableau I.

Le premier groupe (73 souris) développa des tumeurs semblables à celles du premier lot : aucune survivance.

Chez les 38 souris du deuxième groupe, l'inoculat s'affermir progressivement du huitième au quinzième jour, atteignant à



TABLEAU I. — Réactions, à une première et à une seconde réinoculations hypodermiques éventuelles d'une dose tumorale normalement mortelle, d'un lot de 150 souris primo-inoculées dans ou sous la peau au moyen d'une dose (0 c. c. 1) ou d'une demi-dose (0 c. c. 05) uniques d'une émulsion physiologique déterminée de coque tumorale charnue (1).

	SOURIS primo-inoculées (dans ou sous la peau)				RÉSULTATS des premières réinoculations (sous la peau)						RÉSULTATS des secondes réinoculations (sous la peau) 2 mois après les premières			
					8 jours après la guérison clinique		1, 2 ou 3 mois après les premières inoculations				Groupe opérateur 1 : 0 c. c. 1		Groupe opérateur 2 : 0 c. c. 05	
					Groupe opérateur 1 : 0 c. c. 1		Groupe opérateur 2 : 0 c. c. 05		Groupe opérateur 1 : 0 c. c. 01		Groupe opérateur 2 : 0 c. c. 05			
	ou par groupe (réactionnel)	dans la peau	sous la peau	dans la peau	dans la peau	sous la peau	dans la peau	sous la peau	dans la peau	sous la peau	dans la peau	sous la peau	dans la peau	sous la peau
Groupe réactionnel a : souris où la tumeur se développa normalement. . . . .	73	25	35	5	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Groupe réactionnel b : souris où la tumeur s'ébaucha, puis disparut spontané- ment. . . . .	38	45	45	4	4	7 P 8 N	45 P —	2 P 2 N	4 P —	—	—	—	8 P	2 P
Groupe réactionnel c : souris où la tumeur ne se déve- loppa point . . . . .	39	20	40	6	3	—	—	—	20 P	40 P	6 P	3 P	—	—
Total des animaux traités (par lot ou par groupe opé- ratoire). . . . .	450	60	60	45	45	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(1) Dans ce tableau et dans les suivants : P, positif comme chez les témoins; N, négatif.



ce moment les dimensions d'un petit pois. L'état demeura stationnaire durant une semaine environ ; puis la tumeur se résorba lentement et disparut plus ou moins tôt, au plus tard six à sept semaines après l'inoculation.

Chez aucune des 39 souris du troisième groupe, la tumeur ne prit corps ; et plus aucune trace de l'inoculation n'était visible huit à quinze jours plus tard.

Les deux derniers groupes mirent ainsi à notre disposition : d'une part, 38 souris cliniquement guéries d'une atteinte sarcomateuse légère ; d'autre part, 39 souris injectées par deux voies différentes et à deux doses dissemblables, tout à fait comme les précédentes, mais n'ayant jamais donné lieu à une éclosion tumorale. Comment allaient réagir les unes et les autres à une réinoculation, sous la peau, d'une dose de bouillie non diluée, normalement toujours mortelle ?

TABLEAU II. — Répartition des souris réinoculées après une primo-inoculation restée sans effet.

	0 c. c. 1		0 c. c. 05	
	intra-dermique	sous la peau	intra-dermique	sous la peau
Nombre d'animaux inoculés sous la peau un mois après la primo-inoculation. . . . .	6	3	2	1
Nombre d'animaux inoculés sous la peau deux mois après la primo-inoculation . . . . .	6	3	2	1
Nombre d'animaux inoculés sous la peau trois mois après la primo-inoculation . . . . .	8	4	2	1
Nombre d'animaux chez qui la primo-inoculation ne se développa point. .	20	10	6	3

Les 38 souris guéries reçurent sous la peau, huit jours après la résorption de leur nodule tumoral, 0 c. c. 1 de cette bouillie. Les 19 d'entre elles, dont la primo-inoculation avait eu lieu sous la peau, et 9 de celles dont la primo-inoculation avait eu lieu dans la peau (7 souris injectées au moyen de 0 c. c. 1 et 2 souris au moyen de 0 c. c. 05 d'émulsion) réagirent comme les animaux témoins. Les 10 autres restèrent clini-

quement indemnes durant deux mois ; mais, réinoculées à ce moment une deuxième fois sous la peau, dans les mêmes conditions que la première, elles développèrent un sarcome dont l'évolution se fit comme d'habitude.

Les 39 souris, restées apparemment indemnes à la suite de leur première inoculation au moyen de l'émulsion, furent injectées une seconde fois, toutes sous la peau et à la dose habituelle de 0 c. c. 4 de bouillie pure, un mois (12 souris), deux mois (12 souris) ou trois mois (15 souris) après la primo-inoculation (répartition suivant le tableau II) : toutes développèrent une tumeur dont l'aspect et l'évolution ne diffèrent en rien de ceux des animaux témoins.

*Il résulte de ces observations que, lorsque des souris blanches guérissent d'une inoculation dans la peau effectuée au moyen d'une dose fréquemment mortelle de sarcome Ehrlich, éventualité qui se présenta 19 fois sur 75 dans nos expériences, un certain pourcentage (10 sur 19 dans cette série) présente, à l'égard d'une réinoculation hypodermique d'une dose normalement toujours mortelle par cette voie, une immunité qui se caractérise par un état réfractaire. Toutefois, la protection ainsi conférée ne se manifeste plus à l'égard d'une deuxième réinoculation, pratiquée dans les mêmes conditions deux mois après la première.*

\*  
\* \*

Nous avons tâché d'accentuer le phénomène immunologique enregistré, en administrant à d'autres animaux une plus grande quantité tumorale répartie en différents endroits.

Notamment, 20 souris reçurent en une fois dans la peau dorsale, la moitié 0 c. c. 2 et les 10 autres 0 c. c. 3 d'émulsion de coque charnue virulente dans 20 cent. cubes d'eau physiologique, ces doses étant réparties à raison de 0 c. c. 1 en 2 ou 3 endroits différents espacés d'un centimètre environ.

Aucune différence ne se manifesta dans le développement des inoculats, suivant que ceux-ci comportèrent 2 ou 3 doses séparées. Aussi pouvons-nous le décrire en bloc (tableau III).

Chez 9 souris, la tumeur se développa en un ou plusieurs



TABLEAU III. — Réactions, à une première et à une seconde réinoculations hypodermiques éventuelles d'une dose tumorale normalement mortelle, d'un lot de 20 souris primo-inoculées dans la peau au moyen d'une dose double (0 c. c. 2) ou d'une dose triple (0 c. c. 3), réparties simultanément sur deux ou trois endroits différents, d'une émulsion physiologique déterminée de coque tumorale charnue.

	SOURIS primo-inoculées (dans la peau)			RÉSULTATS des premières réinoculations (sous la peau)				RÉSULTATS des secondes réinoculations (sous la peau) 2 mois après les premières	
	Total des animaux traités (par lot ou par groupe réactionnel)	Groupe opératoire 1 : 0 c. c. 2	Groupe opératoire 2 : 0 c. c. 3	8 jours après la guérison clinique		1 mois après les primo-inoculations		Groupe	Groupe
				Groupe opératoire 1 : 0 c. c. 2	Groupe opératoire 2 : 0 c. c. 3	Groupe opératoire 1 : 0 c. c. 2	Groupe opératoire 2 : 0 c. c. 3		
Groupe réactionnel <i>a</i> : souris où la tumeur se développa normalement. . . . .	9	4	3	—	—	—	—	—	—
Groupe réactionnel <i>b</i> : souris où la tumeur s'ébaucha, puis disparut spontanément. . . .	5	3	2	2 P 4 N	4 P 4 N	—	—	4 P	4 P
Groupe réactionnel <i>c</i> : souris où la tumeur ne se développa point . . . . .	6	3	3	—	—	3 P	3 P	—	—
Total des animaux traités (par lot ou par groupe opératoire).	20	10	10	—	—	—	—	—	—

des endroits injectés et provoqua la mort dans un délai de six semaines.

Chez 6 autres, la tumeur ne prit pas corps et l'inoculat disparut sans trace huit à quinze jours plus tard.

Chez les 5 animaux restants, la tumeur s'ébaucha en un seul endroit, atteignit les dimensions et la dureté d'un petit pois, pour disparaître ensuite au plus tard six à sept semaines après l'inoculation.

Ces 5 dernières souris reçurent sous la peau, huit jours après leur guérison clinique, 0 c. c. 1 de bouillie pure de coque charnue virulente : 3 réagirent comme les animaux témoins. Les 2 autres restèrent cliniquement indemnes durant deux mois ; mais une nouvelle inoculation d'une même dose sous la peau, effectuée à ce moment, provoqua chez elles des tumeurs semblables à celles des animaux témoins.

Les 6 souris, restées cliniquement indemnes à la suite de leur première inoculation intradermique, reçurent sous la peau la dose normalement toujours mortelle de 0 c. c. 1 de bouillie pure, un mois après la primo-inoculation : toutes développèrent une tumeur à évolution habituelle.

*L'on peut déduire de ce deuxième groupe d'observations que l'immunité constatée chez nos souris du premier groupe n'augmente pas avec l'administration d'une dose tumorale plus grande, répartie en plusieurs endroits.* En effet, sur 5 animaux guéris des tumeurs survenues après les inoculations intradermiques, 2 seulement se révélèrent réfractaires à une première réinoculation, sous la peau, au moyen d'une dose tumorale constamment mortelle chez les animaux neufs ; cependant qu'ils ne présentèrent plus aucune résistance apparente à une deuxième réinoculation pratiquée, dans les mêmes conditions, un mois après la première.

\*  
\* \*

Une dernière variante expérimentale consista dans l'administration, à 10 souris, de 3 injections intradermiques de 0 c. c. 1 d'émulsion virulente, répartie, de huit en huit jours, en différents endroits de la région dorsale (tableau IV).



TABEAU IV. — Réactions, à une première et à une seconde réinoculations hypodermiques éventuelles d'une dose tumorale normalement mortelle, d'un lot de 10 souris primo-inoculées dans la peau au moyen d'une dose triple (0 c. c. 3), répartie de huit en huit jours sur trois endroits différents, d'une émulsion physiologique déterminée de coque tumorale charnue.

	SOURIS primo-inoculées (0 c. c. 3 d'émulsion dans la peau)	RÉSULTATS des premières réinoculations (sous la peau)		RÉSULTATS des secondes réinoculations (sous la peau) 1 mois après les premières
		Total par lot et par groupe réactionnel	8 jours après la guérison clinique	
Groupe réactionnel <i>a</i> : souris où la tumeur se développa norma- lement . . . . .	5	—	—	—
Groupe réactionnel <i>b</i> : souris où la tumeur s'ébaucha, puis dis- parut spontanément. . . . .	3	{ 4 P 2 N	—	2 P
Groupe réactionnel <i>c</i> : souris où la tumeur ne se développa point.	2	—	2 P	—
Total des animaux traités (par lot).	10	—	—	—

Chez 2 de ces 10 animaux, aucune lésion n'apparut, et une inoculation, effectuée sous la peau à la dose de 0 c. c. 1 de bouillie pure, un mois après la dernière injection intracutanée, provoqua un sarcome dont l'évolution se fit comme d'habitude.

3 autres souris développèrent, après l'une ou l'autre de leurs 3 injections d'émulsion, une tumeur à évolution normale aboutissant à la mort : lorsque ce développement fut provoqué par la première ou la deuxième inoculation, la ou les inoculations ultérieures n'accusèrent sur lui aucun retentissement.

Les 3 souris restantes se comportèrent comme les 3 précédentes, avec cette différence que leur tumeur ne fit que s'ébaucher et disparut au bout de huit jours. L'une d'elles réagit par un sarcome mortel, et les 2 autres ne réagirent plus à une réinoculation de 0 c. c. 1 de bouillie sous la peau, pratiquée huit jours après la guérison clinique. Les deux

derniers animaux pourtant, apparemment immunisés, développèrent, à la suite d'une deuxième réinoculation de 0 c. c. 1 de bouillie sous la peau effectuée un mois plus tard, une tumeur sarcomateuse entraînant la mort après cinq semaines environ.

*Ce troisième groupe d'observations montre que plusieurs inoculations intradermiques d'émulsion, espacées de huit jours, ne semblent que modifier légèrement la fréquence de l'immunité conférée : 2 sur 3 animaux guéris ne firent un sarcome mortel qu'après une deuxième réinoculation sous-cutanée de 0 c. c. 1 de bouillie.*

#### CONCLUSIONS.

I. *Si on administre à la souris blanche, dans la peau, 0 c. c. 1 d'une émulsion de roque charnue entière de sarcome Ehrlich frais de la souris, de la grosseur d'une cerise, dans 20 cent. cubes d'eau physiologique, soit une fois, soit trois fois simultanément ou à huit jours d'intervalle, on observe que près de la moitié (87 sur 180 animaux dans nos expériences) succombe au néoplasme, tandis qu'un quart environ (47 sur 180) paraît demeurer indemne, et que l'autre quart (46 sur 180) ne fait qu'ébaucher une atteinte tumorale et en guérit au bout de huit jours.*

II. *Si on recherche, chez le quart qui ne réagit pas, ainsi que chez celui qui guérit d'une tumeur ébauchée, la présence éventuelle d'une immunisation à l'égard d'une réinoculation sous-cutanée d'une certaine dose normalement toujours mortelle par cette voie, on constate que la réponse est négative chez le premier de ces quarts ; que chez l'autre, par contre, il semble s'être développé un état réfractaire relatif : en effet, une première inoculation d'épreuve demeure ici inopérante, et une seconde, effectuée 1 à 2 mois plus tard, produit son effet habituel.*

Nous pouvons donc confirmer, pour un sarcome Ehrlich de la souris et dans une certaine mesure, que l'immunisation de Besredka, par la voie intradermique, est réalisable avec succès.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BESREDKA (A.). *Ces Annales*, **35**, 1921, p. 421.
- [2] BESREDKA (A.). Résumé Conf. 7<sup>e</sup> Crs Tomarkin, *Le Scalpel*, n<sup>o</sup> spécial, oct. 1935.
- [3] BESREDKA (A.). *La Presse Médicale*, n<sup>o</sup> 98, 7 déc. 1935, p. 1977.
- [4] BESREDKA (A.) et GROSS (L.). *C. R. Acad. Sciences*, **200**, n<sup>o</sup> 9, 25 fév. 1935, p. 790.
- [5] BESREDKA (A.) et GROSS (L.). *C. R. Acad. Sciences*, **200**, n<sup>o</sup> 18, 29 avril 1935, p. 1550.
- [6] BESREDKA (A.) et GROSS (L.). *Ces Annales*, **55**, nov. 1935, p. 491.
- [7] BESSEMANS (A.) et ASAERT (L.). *Ces Annales*, **57**, nov. 1936, p. 516 (1<sup>re</sup> note).
- [8] BESSEMANS (A.) et ASAERT (L.). *Ces Annales*, **57**, déc. 1936, p. 631 [2<sup>e</sup> note].

**APPLICATION**  
**DE LA MÉTHODE DES CULTURES DE TISSUS**  
**A L'ÉTUDE DU VIRUS DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE**

**CULTURE ET PASSAGES EN SÉRIE *IN VITRO***  
**DU VIRUS DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE EUROPÉEN**  
**DE DIFFÉRENTES SOUCHES**

par M. C. JAZIMIRSKA-KRONTOWSKA, H. P. SAVITSKA,  
P. L. SOLITERMAN et T. S. SCHWEDKOWA-ROCHÉ.

*(Institut bactériologique de Kiev.  
Service de Médecine expérimentale.)*

En étudiant les virus *in vivo*, on a remarqué leur tendance à s'unir d'une façon plus ou moins étroite avec les cellules et les tissus de l'organisme. Dès que les savants, étudiant les ultravirus, eurent connu la méthode des cultures de tissus, ils l'appliquèrent aussitôt à la culture des virus. Rivers estime que, bientôt, l'étude des virus en cultures de tissus sera aussi facile que celle des bactéries sur les milieux habituels.

Ce présent travail est la suite de toute une série de travaux exécutés par le Service de Médecine expérimentale sur l'application de la méthode des cultures de tissus à l'étude du virus du typhus exanthématique.

Pour cultiver ce virus et conserver sa virulence par passages, ainsi que pour l'observer dans toutes ses générations, nous nous sommes servis, comme matériel infectant, de plasma du sang de cobaye malade, pris à une dose inférieure à la dose infectante, ce qui a permis d'étudier la question de la multiplication du virus en tissu normal *in vitro*.

Dans une première série d'essais (Krontowsky, Jazimirska-Krontowska, Savitzka, Soliterman), nous avons appliqué la méthode habituelle à la culture du virus du typhus exanthématique : goutte pendante en présence de cellules, ou tissu



d'un animal sain et normal en milieu de plasma additionné d'extrait.

L'inoculation de cultures de tissus ou de cellules tuées par ébullition n'a jamais entraîné d'infection chez les cobayes, ce qui prouve que la multiplication du virus en présence de cellules ou de tissus morts est impossible ; l'existence et la multiplication du virus du typhus exanthématique sont liées aux cellules ou tissus vivants.

Dans une deuxième série d'expériences, en vue d'obtenir une culture du virus du typhus exanthématique et de l'inoculer en série, nous nous sommes servis de la méthode de culture de Carrel et Rivers, sur milieux solides et liquides, en fioles de Carrel, en nous efforçant d'introduire dans le milieu les éléments des tissus sains (dans une partie des essais, de la rate, dans l'autre, des parcelles de tunique vaginale). Comme matériel infectant, nous avons employé, à une dose inférieure à la dose infectante, du plasma de cobaye atteint de typhus exanthématique. Après un séjour de sept jours à l'étuve à 35°, un passage fut effectué : les cultures furent examinées au microscope, leur croissance enregistrée et une partie prélevée pour les passages, les autres devant servir à préparer le vaccin. Un milieu, soit sans fragments de tissus, soit contenant des fragments de tissus préalablement tués à l'ébullition, tenait lieu de contrôle. Le passage a été réalisé comme suit : le liquide et le milieu solide des fioles de Carrel furent mélangés, broyés et passés à travers une fine toile métallique stérile.

Ce matériel n'a servi qu'à inoculer les cultures préparées des tissus et du plasma de cobaye sain : des fragments de tunique vaginale ou de rate d'un millimètre carré furent introduits dans des boîtes de Petri stériles, dans lesquelles on ajouta le contenu des fioles de Carrel du passage précédent ; on laissa pendant quinze à vingt minutes afin de mettre le virus en contact avec les cellules et les tissus des fragments neufs. Ensuite, on introduisit dans chaque fiole 0 c. c. 2 de plasma, 0 c. c. 4 de sérum du cobaye dilué avec de la solution de Tyrode, 1 c. c. 3 et 0 c. c. 2 de matériel contenant le virus et les fragments tissulaires. Finalement, on ajouta dans chaque

fiole 0 c. c. 8 de solution de Tyrode ; le virus était ainsi dilué à 1 p. 7, soit une dose moindre que la dose infectante pour un cobaye.

Nous nous sommes efforcés d'inoculer, presque avec chaque génération de culture, 2 cobayes par voie intrapéritonéale. Nous gardions l'un d'eux jusqu'à la fin de la maladie, en vue d'obtenir une courbe thermique complète et d'éprouver son

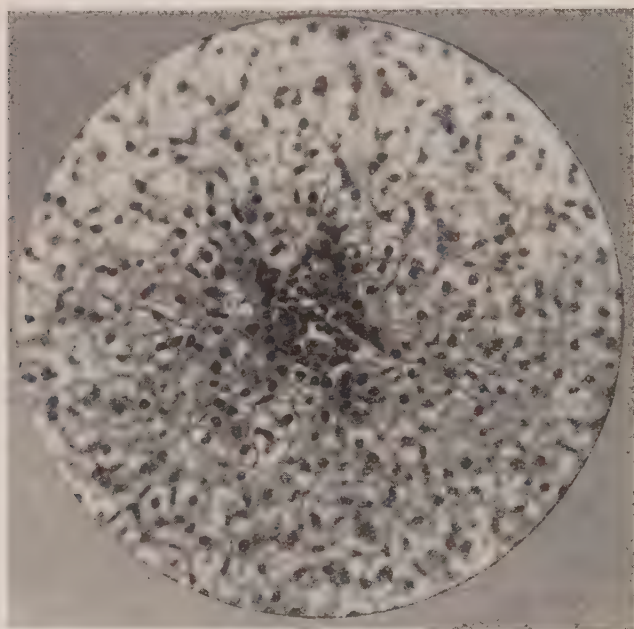


FIG. 1. — Nodule de la paroi d'un capillaire du foie du cobaye n° 157, inoculé avec une culture de dixième génération.

immunité. Avec les organes du second animal, sacrifié au moment de l'ascension de la température, nous avons fait des passages sur 2 autres cobayes et nous avons soumis leurs organes à un examen histo-pathologique.

Voici quelques exemples de ces expériences :

Le cobaye N° 95 est inoculé avec une culture de troisième passage (souche Kr) où le virus du typhus exanthématique a passé vingt et un jours hors de l'organisme ; au troisième jour de l'accès fébrile le cobaye

est sacrifié, et, avec l'émulsion de ses organes, on inocule les cobayes N° 97 et N° 98. Les organes sont soumis à l'examen histologique.

Le cobaye N° 173 est inoculé avec une culture de quinzième passage et le cobaye N° 182 est inoculé avec une culture du vingt et unième passage où le virus du typhus exanthématique a passé cent quarante-sept jours hors de l'organisme, c'est-à-dire près de cinq mois. Le cobaye N° 182 est sacrifié, et deux passages *in vivo* sont faits avec ses organes sur les cobayes N° 188 et N° 189 (deuxième passage *in vivo*). Ces animaux ont donné des courbes de température caractéristiques. Nous avons obtenu le même résultat avec des cultures de typhus exanthématique de différentes générations d'une autre souche, la souche Kz. Comme on le voit

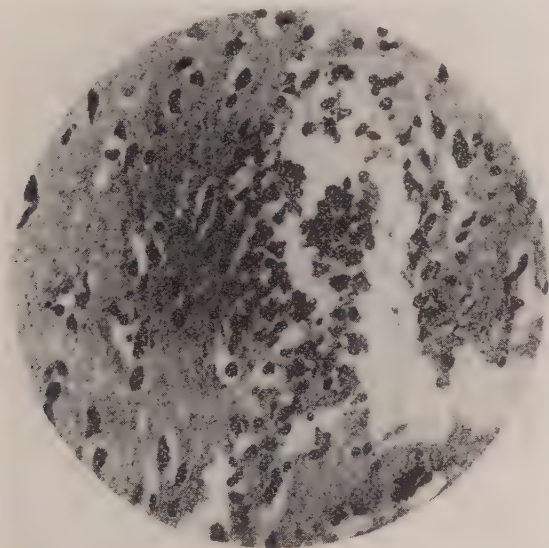


FIG. 2. — Nodule typique d'élément glial du cerveau du cobaye n° 173, inoculé avec une culture de quinzième génération.

sur la microphotographie, des changements histopathologiques N°s 1 et 2 marqués se traduisent, dans le cerveau et le foie, par des nodules caractéristiques du typhus exanthématique.

Il faut remarquer que les changements histopathologiques, chez les cobayes inoculés avec une culture pure du typhus exanthématique, en fiole de Carrel de différentes générations, se révèlent, tant par leur qualité que par leur quantité, d'une façon bien moins intense que chez les cobayes inoculés avec un virus passé sur des cobayes. A côté des nodules typiques



peu nombreux, on voit des formes nodulaires effacées. Outre ces changements, il faut noter des végétations verruqueuses dans le cœur et le foie, formant parfois des excroissances fongiformes à la surface des organes qui sont, aussi d'après Davydowsky, un signe caractéristique du typhus exanthématique expérimental. Ce signe est surtout très prononcé dans les cultures de la souche Kr ; il paraît être sa caractéristique *in vivo* comme *in vitro*.

En cultivant le virus du typhus exanthématique européen, il est très difficile de déceler les *Rickettsia* dans les cultures de tissus dont le premier matériel est le plasma du sang d'un cobaye, bien que quelques auteurs aient réussi à les observer (Wolbach et Schlesinger, Yu, etc.).

Dans son ouvrage sur la culture des *Rickettsia* du typhus exanthématique européen et du typhus mexicain sur l'allanto-chorion de l'embryon de poulet, Zia (1934), qui infectait la membrane de l'allanto-chorion avec une émulsion de cerveau et de rate d'un cobaye, montre que ce n'est qu'après de longues recherches, faites sur des frottis, qu'il réussit à trouver la disposition intra- et extracellulaire des *Rickettsia*.

Les lapins infectés avec la souche européenne font une maladie inapparente sans aucun symptôme clinique, malgré la réaction positive de Weil-Félix de leur sérum. Nous avons inoculé des lapins, par voie intraveineuse, avec des cultures du virus du typhus exanthématique de différentes générations, ainsi qu'avec de l'émulsion du cerveau de cobayes, faisant leur fièvre et infectés avec une culture pure, soit d'une autre, soit de la même génération. Chaque lapin a reçu 1/10 de cerveau de cobaye. Sur 5 lapins infectés avec le cerveau du cobaye malade, 2 ont donné une réaction positive de Weil-Félix à 1 p. 10 et à 1 p. 20. 2 lapins, qui avaient reçu 1/50 du cerveau, ont fait une réaction négative, de même que les lapins inoculés par voie intraveineuse avec 1 cent. cube de culture, en fiole de Carrel ; tandis que les cobayes, inoculés par voie intrapéritonéale avec 2 cent. cubes du sang du même lapin pris simultanément, ont fait une maladie typique avec des modifications caractéristiques histo - pathologiques. Les lapins, inoculés par voie intraveineuse avec 3 cent. cubes de

culture du onzième passage, ont fait une réaction de Weil-Félix positive, 1 p. 10, 1 p. 20. Avant l'inoculation du matériel, tous les lapins avaient une réaction de Weil-Félix négative.

Une étude minutieuse des cultures de différentes générations nous montre qu'avec les passages *in vitro*, la virulence du virus du typhus exanthématique baisse quelque peu. On observe une période d'incubation prolongée, une fièvre assez courte, et, dans les organes des cobayes infectés avec des cultures pures, des changements histo-pathologiques moins intenses que chez les cobayes infectés avec les premières souches. Soumis à une épreuve d'immunité, les cobayes, infectés avec les cultures pures du virus et ayant présenté une maladie typique, se sont montrés réfractaires à la réinfection avec des virus de passage.

Etant donné que la virulence de la culture pure du virus du typhus exanthématique *in vitro* est quelque peu abaissée, et nous inspirant des expériences de Nicolle, Sparrow et Conseil sur la vaccination de l'homme, avec une dose minime de virus vivant passé par cobaye, nous avons résolu de soumettre ces cultures à un essai.

Des cultures de troisième et de sixième génération, provenant de fioles de Carrel, furent injectées sous la peau de 2 sujets. Le premier reçut 2 c. c. 2 de culture de troisième génération, le second 1 c. c. 6 de culture de sixième génération. Avant l'injection, la température des deux sujets était normale.

Le onzième jour après l'injection, on constata chez les deux sujets un malaise général, des douleurs de tête, des reins et des jambes et une ascension de température insignifiante.

On ne peut attribuer ce symptôme à la grippe, car aucun cas de grippe n'a été enregistré au mois de juin 1934. D'ailleurs, les 2 sujets d'expérience vivaient complètement isolés de la population. Cependant, d'après l'état général, les phénomènes rappelaient une forme légère de grippe. L'un se sentait si bien qu'il n'avait pas cessé de travailler ; le deuxième dut garder le lit deux jours. Pendant douze jours, les malades présentèrent une température subfébrile qui revint ensuite jusqu'à la normale. Pendant la période d'incubation, le quatrième jour après l'injection, le sang fut prélevé et soumis à la réaction de Weil-Félix. Celle-ci fut positive à 1 p. 40 pour le N° 1, à 1 p. 20 pour le N° 2. Au dixième jour de la « maladie », le sang fut de nouveau prélevé, soumis à la réaction de Weil-Félix, et inoculé par voie intrapéritonéale à des cobayes à la charge de 2 cent. cubes. Leurs courbes thermiques ne sont pas caractéristiques. La réaction de Weil-Félix a donné des résul-

tats positifs à 1 p. 80 + + + pour le N° 1, et 1 p. 80 + + pour le N° 2. La réaction avec la souche *Proteus*, de Kiev, était plus prononcée que la réaction avec la souche de Leningrad. Un mois après l'injection, le titre de la réaction baissait : 1 p. 20 + pour le N° 1 et pour le N° 2. Neuf mois après, le N° 1 fut soumis à un essai d'immunité. Il a servi pendant quarante minutes à nourrir 10 poux infectés de typhus exanthématique. Aucun trouble ne fut observé. La température, prise systématiquement pendant un mois, n'a rien montré d'anormal.

En même temps, le cobaye infecté avec la culture préparée de l'intestin d'un des poux du même groupe, mais pris avant le repas, fit une maladie typique. Douze jours après le repas, le sang fut prélevé et soumis à la réaction de Weil-Félix qui s'est montrée positive à 1 p. 160. Dix jours plus tard, le titre avait une tendance à s'abaisser, et, après un mois et demi, il s'abaissa à 1 p. 40.

Nous avons préparé des vaccins formolés (0,2 p. 100) avec des cultures de différentes générations. Des injections intrapéritonéales de 0 c. c. 4 de vaccin furent faites trois fois à des intervalles de six jours.

Chaque cobaye reçut 1 c. c. 2 de virus formolé. Avec le premier vaccin de troisième génération, 4 cobayes furent inoculés, 2 ont succombé pour des causes étrangères; les 2 autres sont tombés malades. Dans la suite, nous avons augmenté la quantité du formol jusqu'à 0,35 p. 100 et nous avons injecté sous la peau, 0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c. c. 3, 0 c. c. 4 de vaccin à des intervalles de quatre jours. Les cobayes ont montré des courbes thermiques tout à fait normales. Vingt à trente jours après la dernière vaccination, ils furent soumis à un essai d'immunité par injection intrapéritonéale de 1/20 d'émulsion du cerveau du cobaye faisant sa fièvre. Des cobayes de contrôle non vaccinés furent en même temps inoculés avec la même dose. 12 cobayes au total ont été vaccinés, 2 seulement ont révélé une immunité relative; les 10 autres ont montré des courbes de température typique et ont fait leur fièvre en même temps que les cobayes de contrôle.

En résumé, nous pouvons dire que la question principale concernant la culture et la conservation par passage hors de l'organisme de virus européen du typhus exanthématique, en cultures de série, est aujourd'hui résolue. On a réussi à infecter des cobayes avec des cultures de typhus exanthématique de différentes générations. Les animaux présentent une maladie caractéristique suivie de changements histo-pathologiques des organes. Cette maladie est transmissible au cobaye par passages. Les lapins inoculés avec une culture ou des organes d'un cobaye malade ne font qu'une faible réaction positive de Weil-Félix.

Inoculée à l'homme, à dose minime, la culture provoque des formes effacées qui se manifestent sans éruption (typhisation à petites doses) et rappellent une forme légère de grippe



ambulatoire avec immunité ultérieure, très solide contre la réinfection naturelle (morsures de poux).

Le virus obtenu dans les conditions de nos expériences ne peut pas servir à préparer du vaccin. Les résultats négatifs de nos essais avec des vaccins formolés provenant de cultures dont le matériel d'ensemencement provenait des cobayes, concordent avec ceux de Barykine et ses collaborateurs (1932), Kligler et Olitzky (1932).

Ayant obtenu une culture nette du typhus exanthématique, nous avons préparé un vaccin, bien que toutes les données bibliographiques montrent que le seul vaccin donnant des résultats positifs est le vaccin de Weil, dont le premier matériel provient d'un pou typhique.

Le résultat négatif de l'immunisation des cobayes avec le vaccin préparé à partir de la culture, où comme matériel infectant on avait employé le plasma du sang d'un cobaye atteint de typhus exanthématique, nous a déterminés à faire des essais dans le but d'obtenir une culture du virus du typhus exanthématique d'un pou.

Nous avons déjà fait nos premières expériences lorsque nous avons lu l'ouvrage de Kligler et Aschner (1933), portant sur la culture de *Rickettsia* du typhus exanthématique européen dans les cultures de tissus.

Pour cultiver le virus du pou, nous nous sommes servis de la méthode de culture en milieux à deux couches solides et liquides en fioles de Carrel, d'après la méthode Carrel et Rivers.

Les poux prélevés sur une personne saine, furent nourris pendant six jours sur une malade atteinte de typhus. Le dernier repas était fait le matin du sixième jour afin de prendre l'intestin des poux le septième jour, c'est-à-dire vingt-quatre heures après.

On trempait les poux pendant trois à cinq minutes dans de l'alcool, on les lavait dans de la solution de Ringer contenue dans 5 à 8 boîtes de Petri, on les posait ensuite sur une lame et on les préparait avec des aiguilles stériles à l'aide d'une lentille dont l'oculaire était recouvert de papier à filtrer stérile. Grâce à ces précautions, nous avons réussi à obtenir dans 95 p. 100 des cas, des intestins tout à fait stériles. On mettait ensuite l'intestin préparé dans un mortier d'agate, on le broyait avec II gouttes de solution de Tyrode et on ajoutait encore 0 c. c. 5 de ladite solution. L'émulsion préparée de l'intestin d'un pou infecté servait à inoculer les tissus sains des cobayes, c'est-à-dire la tunique vaginale coupée en petits morceaux. Un intestin servait à ensemercer 2 fioles de Carrel.

Nous avons réussi à obtenir 12 souches de virus « du pou ». Les cultures avaient été placées à l'étuve pendant dix jours à 32° C.

La culture du virus du pou, d'après notre méthode, nous a permis de la garder plus de neuf mois; au delà de ce délai, elle se montrait encore capable de provoquer le typhus expérimental chez les cobayes.

Les cobayes inoculés avec une quantité minime (0 c. c. 5 à 1 cent. cube) du contenu des fioles de Carrel de différentes générations, ont présenté une maladie nette, transmissible au cobaye neuf.

La période de fièvre chez les cobayes infectés avec une culture de virus « du pou », a duré de deux à trois jours.

Nigg (1933) dit qu'il a réussi à inoculer par passages, pendant deux ans et six mois, le virus du typhus mexicain, lequel avait gardé sa virulence et ses qualités.

Pour le contrôle, des cultures furent de même préparées à partir de l'intestin de poux sains. L'inoculation intrapéritonéale de ces cultures n'a pas provoqué de maladie; les courbes thermiques ont été normales et les examens histo-pathologiques des organes des cobayes n'ont pas montré de changements.

Les lapins inoculés par voie intrapéritonéale ou intraveineuse avec 2 cent. cubes de culture pure de différentes générations du virus « du pou », ainsi qu'avec l'émulsion des organes et du cerveau de cobayes, atteints de typhus exanthématique, ont donné une réaction positive de Weil-Félix à 1 p. 10, 1 p. 20, et dans un cas 1 p. 40. L'infection des poux d'après la méthode de Weigl, avec des cultures de différentes générations, a provoqué la maladie chez ces derniers: quelques-uns succombèrent six à huit jours après l'infection, d'autres survécurent. L'examen de l'intestin des poux a montré une grande quantité de *Rickettsia prowazeki*.

L'examen microscopique des organes des cobayes infectés avec une culture pure du virus « du pou » a révélé des changements caractéristiques dans le foie (fig. 3), le cœur et les reins. Il est intéressant de noter que les cobayes infectés avec le virus « du pou » ne présentent pas d'altérations du système nerveux, comme l'ont déjà signalé Hach et Lebedinsky. Une

seule fois nous avons pu voir un nodule glial dans le cerveau du cobaye N° 249, lequel avait été infecté avec une culture pure de quatorzième génération; des organes (cœur, foie, reins) présentèrent des altérations très prononcées.

Ayant obtenu par passage la culture du virus « du pou », nous avons essayé d'immuniser des cobayes avec du virus formolé et avec du virus phéniqué à 0,5 p. 100.

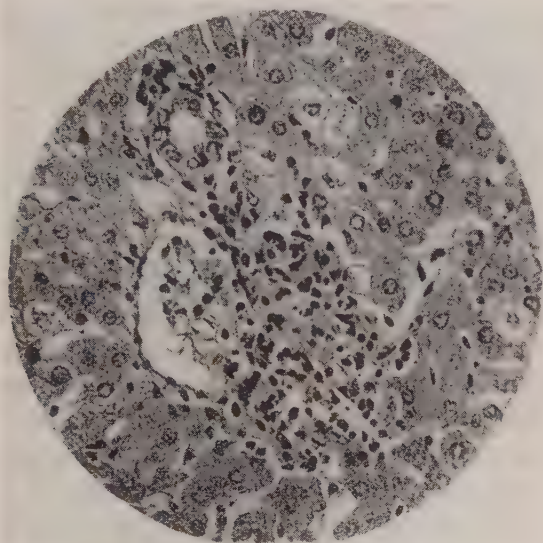


FIG. 3. — Nodule périvasculaire du foie du cobaye n° 217, inoculé avec une culture de sixième génération du typhus « du pou ».

Les cobayes ont reçu trois fois 0 c. c. 5 de vaccin à des intervalles de trois jours. Pour une partie d'entre eux, l'immunité a été éprouvée après quinze jours, les autres après un mois.

40 cobayes ont donné de bons résultats. Les cobayes immunisés, tant avec le virus formolé qu'avec le virus phéniqué du pou provenant de cultures tissulaires de différentes générations, ont montré une immunité solide contre la réinfection ultérieure avec le virus de passage (souche Otto) 50 à 80 unités infectantes et, mieux, 100 à 300 unités infectantes.

Etant donné que Kligler et Olitzky (1932) prétendent que le



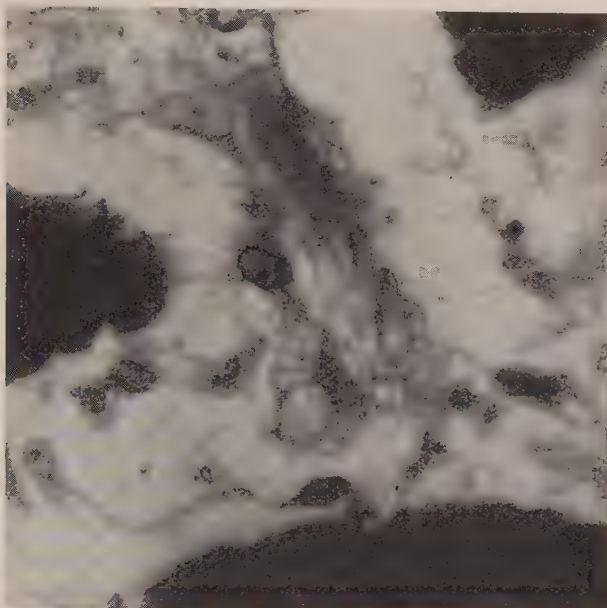
virus du cerveau des cobayes a des propriétés antigènes différentes de celles du virus du pou, et comparant nos essais sur la vaccination avec des cultures du virus du typhus exanthématique, dont le premier matériel était un cobaye, aux expériences avec une culture du virus « du pou », nous devons souligner le succès de l'immunisation avec le virus « du pou ».

Ainsi le virus obtenu des cultures tissulaires de l'intestin de pou infecté de typhus exanthématique et passé en série, est capable d'infecter les cobayes. Les cobayes ayant fait leur maladie se montrent réfractaires au virus de passage. Les cobayes vaccinés avec le virus formolé présentent une immunité stable à la réinfection à grande dose avec le virus vivant passé sur cobayes. Les cellules des cultures tissulaires, tant du fragment que les nouvelles cellules mésothéliales de la tunique vaginale (très commode pour observer les *Rickettsia*) ont révélé une grande quantité de *Rickettsia prowazeki* (fig. 4 a, b).

Dans les deux séries d'expériences, lorsqu'on n'avait pas réussi à trouver les *Rickettsia*, ou bien si celles-ci étaient en quantité minime, les cobayes inoculés avec le vaccin de ces cultures n'ont pas montré de résistance à la réinfection, bien que ces cultures fussent encore infectantes. Cela nous fait penser que pour préparer des vaccins capables de conserver leurs propriétés antigènes, il faut une grande quantité de *Rickettsia*.

Donc les suppositions de Kligler et Olitzky se trouvent vérifiées : le virus obtenu de l'intestin d'un pou manifeste des propriétés antigènes très différentes, grâce à la quantité considérable de *Rickettsia* qui se multiplient facilement, tant dans les cultures de tissus du typhus européen (démonstré pour la première fois par Pinkerton et Haas et ensuite par Kligler et Aschner et confirmé par nos travaux sur toute une série de générations), que dans celles du typhus mexicain (Nigg, 1935).

Nos expériences, ainsi qu'une comparaison morphologique des *Rickettsia* des cellules des cultures du virus « du pou » avec le *Rickettsia* de l'intestin des poux, atteints de typhus exanthématique et à celles de la tunique vaginale d'un cobaye souche Otto, nous déterminent à nous prononcer en faveur de l'identité de ces dernières et de l'importance étiologique des *Rickettsia prowazeki* dans le typhus exanthématique.



*a*



*b*

FIG. 4. — *a, b*, *Rickettsia* des cellules mésothéliales de la tunique vaginale, culture pure du virus « du pou ».

Maintenant que nous avons obtenu une grande quantité de virus « du pou » d'une culture pure en fioles de Carrel, nous pouvons espérer pouvoir résoudre une série de problèmes théoriques aussi bien que pratiques.

#### CONCLUSIONS.

1° Le virus du typhus exanthématique obtenu du plasma du sang d'un cobaye malade de typhus et pris à une dose inférieure à la dose infectante peut se multiplier dans les cultures de tissus. Après passages ultérieurs en fioles de Carrel, il garde sa faculté infectante; il provoque un typhus expérimental chez les cobayes et la réaction de Weil-Félix chez les lapins.

2° La culture inoculée à dose minime à l'homme provoque chez ce dernier des formes effacées de maladie sans éruption (typhisation à petites doses), qui rappellent une forme légère de grippe. Les sujets ainsi inoculés deviennent très réfractaires à la réinfection naturelle (piqûres de poux).

3° Passé en série dans de telles conditions, le virus (d'après nos essais) ne peut servir à préparer le vaccin.

4° Le virus obtenu de l'intestin des poux infectés de typhus peut se multiplier dans les cultures de tissus; il ne perd pas sa faculté infectante après des passages ultérieurs; il provoque chez les cobayes un typhus expérimental et chez les lapins la réaction de Weil-Félix, ainsi qu'une accumulation de *Rickettsia prowazeki* dans l'intestin des poux infectés, d'après la méthode de Weigl, avec des cultures de différentes générations.

5° Le vaccin, préparé avec des cultures contenant une quantité considérable de *Rickettsia*, rend les cobayes très réfractaires à de grandes quantités d'unités infectantes (50, parfois plus de 100 à 300).

6° La morphologie des *Rickettsia* du virus du pou en culture est pareille à celle des *Rickettsia* de l'intestin des poux infectés du typhus exanthématique, à celle de *Rickettsia* de l'intestin des poux infectés, d'après la méthode de Weigl, avec le cerveau de cobayes, atteints de typhus, ainsi qu'à celle de *Rickettsia* de la réaction scrotale chez le cobaye (souche Otto).

De plus, les propriétés immunisantes supérieures du vaccin



préparé avec des cultures contenant une quantité considérable de *Rickettsia*, ainsi que la perfection des qualités antigènes du vaccin de Weigl, nous portent à nous exprimer en faveur de l'importance du rôle étiologique des *Rickettsia* dans le typhus exanthématique.

# BIBLIOGRAPHIE

- BARYKINE (W.), KOMPANEETZ (A.), ZAKHAROW (A.) et BARYKINA (O.). Cit. d'après la monographie de BARYKINE (W.) et DOBREYTZER (A.). *Le typhus exanthématique*, Moscou, 1932, p. 277.
- DAVYDOWSKY (I.). *Anatomie pathologique et pathologie du typhus exanthématique*, Moscou, 1922.
- KLIGLER (I.) et ASCHNER (M.). *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **31**, 1933, p. 349. *Ibid.*, **31**, 1934, p. 808.
- KLIGLER (I.) et OLITZKY (L.). *Zeitschr. für Immunitätsforsch.*, **76**, 1932, p. 355.
- KRONTOWSKY (A.) et HACH (I.). *München. med. Wochenschr.*, 1932, p. 144; *Klin. Wochenschr.*, 1924, p. 1625; *Arch. f. Exper. Zellf.*, **3**, 1926, p. 297; *Zeitschr. für Immunitätsforsch.*, **54**, 1928, p. 237.
- KRONTOWSKY (A.), JAZIMIRSKA-KRONTOWSKA (M.), SAVITZKA (H.) et SOLITERMAN (P.). *Ces Annales*, **53**, 1934, p. 654.
- NICOLLE (Ch.), SPARROW (H.) et CONSEIL (G.). *Presse Médicale*, 1927, p. 503.
- NIGG (C.). *J. exp. Med.*, **61**, 1935, p. 17.
- PINKERTON (H.) et HAAS (G.). *J. exp. Med.*, **54**, 1931, p. 307 ; *Ibid.*, **56**, 1932, p. 131.
- RIVERS (T.). *Arch. exp. Zellfrsch.*, **11**, 1931, p. 353.
- WOLBACH (S.) et SCHLESINGER (M.). *J. med. Research.*, **44**, 1923, p. 231.
- ZIA (S.). *Amer. J. Pathol.*, **10**, 1934, p. 211.
- YU (H.). *Zblt. f. Bakt. Orig.*, **124**, 1932, p. 181.

# LA FLOCCULATION, COMME MÉTHODE DE TITRAGE DES SÉRUMS ANTIDYSENTÉRIQUES

(PREMIÈRE COMMUNICATION)

par K. HALAPINE, L. BASILEVSKAIA et N. SCHITKOVA.

(Section d'Epidémiologie  
de l'Institut de Médecine Expérimentale de l'U.R.S.S.  
Directeur de la Section : Prof. P. ZDRODOVSKI.)

La floculation dans un mélange de toxine dysentérique et de sérum correspondant, a été observée pour la première fois par G. Ramon et Dumas, en 1925. Ces auteurs ont vu apparaître dans quelques tubes, après plusieurs heures de contact, une opalescence qui augmentait d'intensité et aboutissait à la formation de flocons épais qui se déposaient au fond des tubes. Le mélange toxine-antitoxine, dans le tube qui a flocculé le premier, s'est montré neutre en injection au lapin. La toxine dans ce tube était donc neutralisée par le sérum.

La réaction est spécifique, à marche lente. Les auteurs français n'indiquent que très succinctement la possibilité d'une application pratique de cette réaction dans le titrage des sérums.

En étudiant la réaction de floculation dans un mélange de toxine et sérum dysentériques, nous avons pu pleinement confirmer les observations de Ramon et Dumas, c'est-à-dire l'apparition de la floculation initiale et sa spécificité absolue. De plus, nous croyons pouvoir affirmer la constance de cette réaction; elle est de règle dans les mélanges de toxine dysentérique avec tous les sérums. La floculation n'a jamais manqué dans les 400 séries de sérums que nous avons étudiées.

Ce qui distingue la floculation dysentérique de celle que l'on observe dans les mélanges de toxine et antitoxine diphtériques, c'est qu'on y décèle plusieurs zones où la réaction apparaît sous forme de floculation, chaque zone présentant, dans un des tubes, une floculation initiale.

Pour observer ces zones multiples, une longue rangée de tubes est nécessaire, 40 à 50 par exemple, avec doses décroissantes de sérum. Le tableau I représente le schéma d'un essai de titrage.

TABLEAU I. — Schéma de la réaction de flocculation.

QUANTITÉ de sérum dilué 1/5	DOSE DE TOXINE 3 cent. cubes	SÉRUM à 2 zones	SÉRUM à 3 zones
3	"	+	"
"	2,9	+	"
2,8	"	+	"
"	2,7	+	"
2,6	"	+	"
"	2,5	+	"
2,4	"	+	+
"	2,3	+	+
2,2	"	+	+
"	2,1	+	+
2	"	"	+
"	1,9	"	+
1,8	"	"	+
"	1,7	"	"
1,6	"	"	"
"	1,5	"	"
1,4	"	"	"
"	1,3	"	"
1,2	"	"	"
"	1,1	"	"
1	"	"	"
"	0,9	"	"
0,8	"	"	"
"	0,7	"	"
0,6	"	+	"
"	0,5	+	+
0,4	"	+	+
"	0,3	+	+
0,25	"	"	+
"	0,2	"	"
0,15	"	"	"
"	0,1	"	"
0,09	"	"	"
"	0,08	"	"
0,07	"	"	+ 1 <sup>re</sup> zone.
"	0,06	"	"
0,05	"	"	"
"	0,04	"	"
0,03	"	"	"
"	0,02	"	"
0,01	"	"	"



Nous nous servons d'habitude de la technique suivante : Le sérum, dilué à 1/5, est versé en quantités décroissantes dans une série de tubes; on commence par 3 cent. cubes et on descend jusqu'à 0 c. c. 01 (on se sert de pipettes graduées usuellement pour les quantités au-dessus de 0 c. c. 1, d'une micropipette pour les quantités plus petites). On ajoute 3 cent. cubes de toxine dans chaque tube, on agite soigneusement et on met à l'étuve à 40°. Pour maintenir stériles les tubes, on ajoute à la toxine 1 p. 100 de formol (1).

Les sérums étudiés dans ces conditions peuvent être séparés en 2 groupes : les sérums qui flocculent dans 2 zones et ceux qui présentent 3 zones de floculation. Bien entendu, cette distinction n'est que relative, limitée qu'elle est par le schéma que nous avons adopté.

Ce qui n'est pas sans intérêt, c'est que pendant l'immunisation, on peut observer assez souvent un sérum présentant au début 2 zones de floculation, en montrer dans la suivante 3.

Nous désignerons, au cours de cette étude, comme première zone celle qui floccule avec la plus petite quantité de sérum; la troisième est celle où la réaction apparaît avec la plus grande quantité de sérum; la deuxième est celle qui est située entre la première et la troisième.

Dans les sérums à 2 zones, la première correspond à la plus petite quantité de sérum, la seconde à la plus grande.

La marche de la réaction et l'aspect des tubes diffèrent d'une zone à l'autre. C'est ainsi que la première zone d'un sérum à triple floculation, celle qui correspond à la plus petite quantité de sérum, peut ne pas présenter d'opalescence. quelques flocons isolés, légers, à peine visibles apparaissent dans le liquide transparent et se désagrègent à la moindre agitation. Ce tube à floculation initiale reste longtemps seul, la floculation n'apparaissant dans les tubes voisins que beaucoup plus tardivement. Nous avons déjà signalé l'absence d'opalescence dans la première zone; en général, plus la quantité de sérum, qui provoque la floculation initiale, est petite,

(1) La toxine dysentérique se prépare par ensemencement, en bouillon Martin, alcalinisé à pH 8,4 de la souche « Voile 30 », de l'Institut Pasteur. Séjour à l'étuve à 37° C. pendant quinze jours. Pour les détails de la préparation de la toxine dysentérique, voir la deuxième communication.

plus faible est l'opalescence ; celle-ci n'est bien visible que lorsque la dose de sérum approche 0 c. c. 1.

La deuxième zone est beaucoup plus étendue. Ici, une floculation initiale nette apparaît de règle dans un tube fortement opalescent, les flocons sont nombreux, volumineux et ne se désagrègent que difficilement.

Enfin, la troisième zone est la plus étendue, le liquide dans les tubes est trouble, la floculation initiale est difficile à distinguer, les flocons apparaissent presque en même temps dans plusieurs tubes qui ne s'éclaircissent pas, même après que le précipité se soit déposé au fond.

La première et la deuxième zones de floculation dans un sérum à 2 zones correspondent en tous points à la deuxième et à la troisième zones d'un sérum à 3 zones.

La marche de la réaction dans un mélange de toxine et sérum dysentériques est lente; la vitesse de la floculation (KF) varie de trois à vingt-quatre heures; quelquefois, la floculation apparaît plus tard encore. Les sérums frais réagissent beaucoup plus vite que les sérums âgés.

Avec les sérums à triple floculation, la zone qui floccule la première est celle qui nécessite une quantité minime pour flocculer ; cependant, il arrive quelquefois que la deuxième zone la précède; la floculation dans la troisième zone apparaît toujours en dernier lieu.

Quant aux sérums à 2 zones de floculation, c'est la première zone (à plus petite quantité de sérum) qui débute.

Le liquide dans le tube à floculation initiale de la première zone (sérums à double floculation) injecté aux lapins et aux souris, s'est montré neutre dans la majorité des cas; le mélange avec moins de sérum est toxique, avec une plus grande quantité contient l'antitoxine en excès. Le mélange qui correspond à la floculation initiale de la première zone d'un sérum à 3 zones n'est pas tout à fait neutre. L'injection intraveineuse de ce mélange aux lapins provoque, en général, la mort des animaux du deuxième au cinquième jour. L'évaluation de la toxicité de ce mélange sur des souris a montré que la quantité de sérum dans ce tube neutralise seulement 80 p. 100 de toxine (toxine N° 31). On pourrait en conclure que les 20 p. 100

de toxine étaient neutralisés dans la deuxième zone. En effet, l'injection intraveineuse au lapin a montré que le tube de floculation initiale de la deuxième zone est complètement atoxique. Ainsi, dans les sérums à 3 zones, la première et la deuxième zone se complètent mutuellement, et neutralisent totalement la toxine.

Les tubes à floculation initiale de la troisième zone d'un sérum à 3 zones et la deuxième zone d'un sérum à 2 zones sont atoxiques, contenant un excès de sérum.

La neutralisation entre la toxine dysentérique et le sérum correspondant est lente. Ce n'est qu'après dix à dix-huit heures, à la température du laboratoire, qu'un mélange de toxine et sérum dysentériques devient inoffensif pour la souris.

Passons maintenant au titrage des sérums dysentériques par la méthode de floculation.

La neutralisation de la toxine dysentérique par l'antitoxine correspondante s'effectuant dans la première zone de floculation des sérums à double floculation et dans la première et la deuxième zone de ceux à triple floculation, c'est sur ces tubes à floculation initiale que doit se porter notre attention ; de sorte qu'en pratique une rangée de 15 à 20 tubes suffit pour assurer un titrage convenable. Le sérum dilué cinq fois est ajouté en quantités décroissantes de 1 cent. cube à 0 c. c 01.

Dans nos premiers essais, nous avons appliqué, pour évaluer le titre des sérums dysentériques, les règles du titrage des sérums diphtériques; mais nous nous sommes heurtés à un échec : les résultats de l'évaluation des titres *in vitro* et *in vivo* étaient en discordance ; ainsi la possibilité même de se servir de cette méthode pouvait être mise en doute.

Néanmoins, nous avons continué à titrer les sérums dysentériques par la floculation, car nous avons cru nous apercevoir que pendant l'immunisation d'un même cheval, la dose floculante du sérum présentait des variations quantitatives régulières.

Mettant à profit cette observation, nous avons essayé de prendre comme sérum-étalon le sérum d'une des premières saignées effectuées sur le même cheval.



Nous avons donc procédé comme suit :

Pendant le premier cycle de l'immunisation, nous évaluons, par la floculation, le titre d'une quelconque des saignées d'épreuve, c'est-à-dire que nous déterminons la quantité de sérum qui équivaut (dans la réaction de floculation) à 1 cent. cube de toxine; en même temps, on titre le sérum par la méthode internationale (souris). Nous désignons la relation entre la quantité de sérum qui provoque la floculation initiale et la quantité de UA déterminée par le titrage sur souris, comme « coefficient individuel ». C'est ce coefficient qui nous permet de déterminer, par la floculation, le titre de tous les sérums provenant d'un même cheval.

Le « coefficient individuel » ainsi défini est constant et peut servir à l'évaluation du titre d'un sérum pendant tout le temps d'exploitation du même cheval. Il semble donc que le cheval garde bien son individualité, dont ce coefficient est la marque. On n'arrive à titrer convenablement les sérums dysentériques, en se servant de la floculation et du coefficient individuel, qu'à condition de :

1° Déterminer le coefficient individuel en partant d'un sérum à faible titre, tels sont en général les sérums à double floculation (les saignées d'épreuve du premier cycle d'immunisation).

2° Titrer les sérums provenant des saignées du même cheval avec la même toxine qui a servi pour évaluer le coefficient individuel.

3° La toxine choisie pour la floculation doit présenter avec les sérums-étalons (à double et à triple floculation) le phénomène de la floculation dans les zones caractéristiques. La toxine est considérée comme satisfaisante lorsque, avec un sérum à triple floculation, elle offre toutes les 3 zones (toxine « à trois fractions »).

4° Il est à désirer que la zone floculante du sérum-étalon à 3 zones flocule dans la première zone avec des quantités de sérum-étalon oscillant entre 0 c. c. 08 et 0 c. c. 05 ; de cette façon, on peut être sûr de pouvoir bien titrer par la floculation les sérums très riches en antitoxines. Le mélange, contenu dans le tube initial de la première zone, ne doit pas

TABLEAU II. — Titres des sérums antidyssentériques

NUMÉRO d'ordre	NOM DES CHEVAUX								
		I <sup>er</sup> cycle		II <sup>e</sup> cycle		III <sup>e</sup> cycle			
1	Paille. . . . .	0,017	400	0,013	500	0,007	1.000	0,	0,
2	Saïde. . . . .		300	0,017	400	0,013	1.000	0,	0,
3	Saturne. . . . .		400		400	0,05	450	0,	0,
4	Salamandre. . . . .		400	0,017	300		300	0,	0,
5	Sima. . . . .		400		450		800		
6	Paysan. . . . .	0,01	450	0,013	400	0,007	800	0,	0,
7	Négus. . . . .	0,017	600	0,01	1.200	0,01	1.200	0,	0,
8	Calva. . . . .	0,033	400	0,017	600	0,013	700	0,	0,
9	Le Brave. . . . .	0,05	250	0,01	600	0,01	600	0,	0,
10	Dictateur. . . . .	0,05	400	0,017	1.000	0,02	800	0,	0,
11	César. . . . .	0,05	350	0,033	500	0,007	2.000	0,	0,
12	Coq. . . . .	0,02	450	0,02	450	0,017	500	0,	0,
13	Rojok. . . . .	0,013	800	0,017	600	0,01	1.000	0,	0,
14	Sakla. . . . .	0,01	500	0,013	400	0,007	1 000		
15	Tchervonietz. . . . .	0,005	2.000	0,01	1.000				
16	Saul. . . . .	0,007	1.000	0,002	3.000	0,0007	10 000	0	0
17	Marron. . . . .	0,007	1.400	0,013	700	0,005	1.700	0,	0,
18	Brun. . . . .	0,01	600	0,013	700	0,005	1.200		
19	Comissar. . . . .	0,013	1.500	0,027	800	0,02	1.000	0,	0,
20	Reine. . . . .	0,007	800	0,007	800	0,01	350	0,	0,
21	Zakhar. . . . .	0,01	700	0,005	1.500	0,003	2.500	0,	0,
22	Nakaz. . . . .	0,02	> 500	0,013	1.000	0,02	700	0,	0,
23	Vassal. . . . .	0,02	800	0,013	1.000	0,01	1.500		
24	Barbare. . . . .	0,02	400	0,04	< 300	0,02	400	0	0
25	Ours. . . . .	0,033	600	0,02	1.000	0,02	1.000	0,	0,
26	Myosotis. . . . .	0,033	500	0,02	800	0,023	700		
27	Rassim. . . . .	0,02	800	0,01	1.600				

Remarque : Le titre flocculant est représenté par la quantité de sérum neutralisant 1 cent. cube de toxine.

être neutre dans l'épreuve du lapin (c'est la propriété des sérums à 3 zones).

5° La dose flocculante (première zone) du sérum-étalon à 2 zones est comprise dans les limites 0 c. c. 3, 0 c. c. 25 et 0 c. c. 2 d'une dilution à 1/5 ; le liquide contenu dans le tube à flocculation initiale est en général neutre (épreuve sur lapin).

6° Le changement de toxine doit être suivi d'une détermination du « coefficient individuel » par rapport à la toxine nouvellement choisie.

En voici un exemple de titrage :

Supposons que la dose flocculante d'un sérum à deux zones = 0 c. c. 2 d'une dilution à 1/5, ce qui correspond à 0 c. c. 04 de sérum pour 3 cent. cubes de toxine ; par consé-

és *in vitro* (floculation) et *in vivo* (souris).

UNISATION

V <sup>e</sup> cycle		VI <sup>e</sup> cycle		VII <sup>e</sup> cycle		VIII <sup>e</sup> cycle		IX <sup>e</sup> cycle	
0,005	1.400	0,01	700	0,005	1.400	0,005	1.400		
0,013	1.000	0,013	1.000	0,013	1.000	0,007	2.000	0,0033	4.000
0,007	3.000	0,027	1.000	0,01	2.700	0,017	1.600	0,013	2.000
0,02	500			0,02	500	0,01	700	0,004	2.500
	500	0,01	500	0,005	> 800	0,01	500	0,013	400
0,007	800								
0,01	1.200								
0,007	1.000								
0,0033	3.500								
0,005	2.000								
0,0007	10.000								

quent, 1 cent. cube de toxine est floculé par 0 c. c. 04 :  
3 = 0 c. c. 013.

Le coefficient individuel du cheval est 0 c. c. 01 = 500 UA.

Donc :

$$0 \text{ c. c. } 01 = 500 \text{ UA}$$

$$0 \text{ c. c. } 013 = X$$

d'où :

$$X : 500 = 0,01 : 0,013$$

$$X = \frac{500 : 0,01}{0,013} = 385 \text{ UA.}$$

Passons aux sérums à 3 zones :

Théoriquement le titre d'un sérum à 3 zones doit être égal à la somme des titres de la deuxième et troisième zones, vu



que les deux zones se complètent dans leur action antitoxique. Pratiquement, le titrage des sérums à 3 zones se fait également d'après la première zone quoiqu'elle ne présente pas la zone de la neutralisation complète.

Le titre évalué de cette manière aurait du être un peu plus haut qu'il n'est en réalité. Cependant, les résultats obtenus par le titrage *in vitro* et *in vivo* concordent. L'action neutralisante de la première zone du sérum à 3 zones est de beaucoup plus grande que celle de la deuxième (80 p. 100 de toxine et plus étant neutralisée dans la première zone), ce qui rend l'erreur relativement admissible.

Les résultats du titrage des sérums par la floculation et par la méthode internationale (sur souris) sont représentés dans le tableau II.

Nous y avons mis (pour montrer le titre évalué par la floculation) les quantités absolues de sérums floculant 1 cent. cube de toxine, et, à côté, les titres en unités internationales. On peut ainsi se rendre compte que la dose floculant 1 cent. cube de toxine est proportionnelle au titre exprimé en UA (cependant, quelquefois, il est plus haut). C'est à la réaction de floculation que nous devons la découverte des sérums à titre très haut ; car, autrement, nous ne nous serions pas hasardés à titrer *in vivo* les sérums ayant de 5.000 à 10.000 UA par centimètre cube.

Quelle est la valeur réelle des titres des sérums dysentériques évalués par la floculation à l'aide du coefficient individuel ? Peut-on comparer leur stabilité, par exemple, à celle des titres des sérums antidiphtériques déterminés aussi par la méthode de Ramon, laquelle a pour principe le titrage à l'aide d'une unité antitoxique définie et étalonnée ?

Le fait qu'en titrant les sérums antidysentériques à l'aide de leurs coefficients individuels, nous obtenons presque toujours des résultats concordant avec ceux obtenus par le titrage *in vivo* ; ce fait, disons-nous, pourrait suggérer l'idée que notre méthode n'est pas exempte des défauts que nous connaissons à la méthode biologique : méthode quantitative plutôt, elle pourra montrer une augmentation du titre qui serait dû, peut-être, à l'avidité du sérum.

Or, en admettant ceci, nous pourrions nous attendre à ce que les titres de nos sérums à très grande valeur antitoxique, évaluée par la floculation (10.000 UA, 4.000 UA, 2.000 UA) baissent après un an et demi ou deux ans. Il n'en est cependant rien, comme l'a montré l'expérience. Ceci permet d'admettre que les titres, déterminés par la méthode de floculation et calculés à l'aide du coefficient individuel, sont des titres absolus et stables.

En nous servant dans la détermination du « coefficient individuel » d'un sérum faible (à 400 UA, par exemple) à 2 zones, dont les titres évalués *in vitro* et *in vivo* ne présentent pas de différence, nous obtenons dans le titrage suivant des titres stables, absolus.

Nous en concluons que le titrage des sérums antidysentériques à l'aide du « coefficient individuel » ne cède en exactitude à l'évaluation des sérums diphtériques que par la méthode de floculation.

#### CONCLUSIONS.

1° Nous avons démontré, sur une grande quantité de sérums, que la floculation a toujours lieu entre toxine et sérums dysentériques. La spécificité de cette réaction, signalée par Ramon et G. Dumas a été pleinement confirmée.

2° La floculation dans un mélange de toxine et antitoxine dysentériques a ceci de particulier que la réaction s'observe dans plusieurs zones à condition de faire une longue rangée de dilutions.

3° En se servant de notre schéma, on peut diviser les sérums antidysentériques en sérums à « double » et « triple » floculation.

4° La première zone des sérums à double floculation (correspondant à la plus petite quantité de sérum) est en général celle où la neutralisation est complète.

La première zone d'un sérum à triple floculation ne neutralise que  $\frac{4}{5}$  à peu près de la toxicité totale ; elle donne l'effet antitoxique maximum.

5° Les titres des sérums sont évalués d'après la floculation

initiale apparaissant dans la première zone (des sérums à 2 et 3 zones).

6° Cette évaluation n'est possible qu'à l'aide du « coefficient individuel », c'est-à-dire de la relation qui existe entre la dose flocculante d'un sérum donné et la quantité d'antitoxine en UA qu'il contient dans 1 cent. cube.

7° L'exactitude des titres des sérums antidysentériques peut être garantie à condition qu'on se serve du « coefficient individuel » bien déterminé et d'une toxine convenablement choisie.

8° Les titres évalués par la méthode de flocculation correspondent à ceux obtenus *in vivo* par la méthode internationale ; *in vivo*, ils peuvent contenir dans certains cas un excès d'antitoxine.

9° Les titres des sérums dysentériques, déterminés à l'aide du « coefficient individuel », sont absolus et ne baissent pas à la longue (analogie avec les titres des sérums diphtériques).

## **ACTION DU CHLOROFORME SUR L'AGGLUTINATION FLAGELLAIRE "H" DES VIBRIONS**

par P. CH. VASSILIADIS.

*(Travail du laboratoire de Bactériologie du Conseil sanitaire, maritime et quarantenaire d'Egypte, à Alexandrie.)*

Plusieurs auteurs ont appliqué la méthode de l'analyse des récepteurs chez les vibrions, dans le but de jeter un peu de clarté dans ce groupe si vaste où une grande confusion régnait, à la suite des résultats contradictoires, enregistrés par divers auteurs, sur le comportement sérologique des vibrions, leur production d'hémolysines, etc.

Ces travaux ont montré que les vibrions, à l'instar des autres bactéries mobiles, possèdent un antigène H thermolabile et un antigène O thermostable.

Watanabe, en 1921 (cité par Shousha), a rencontré des antigènes H et O chez les vibrions. Balteanu [1] a fait une étude complète de la question et a établi l'existence de ces mêmes antigènes.

Ensuite Shousha [2], dont les recherches ont été confirmées par Abdoosh [3], Gohar [4], Bruce White [5] et Heiberg [6], a retrouvé les antigènes H et O et a établi que l'antigène H représente un facteur commun au groupe, et que l'antigène O représente un facteur spécifique.

Enfin, Gardner et Venkatraman [7], dans un travail très complet, ont établi une classification basée sur l'analyse des récepteurs.

Ils ont confirmé l'existence d'un antigène thermolabile commun au groupe.

L'étude de l'antigène thermostable leur a montré qu'il existe un certain nombre de ces antigènes spécifiques permettant d'établir temporairement 6 sous-groupes (comprenant chacun au moins 2 souches).



## Matériel et technique. — Souches utilisées.

NOM	LIEU ET DATE d'isolement	ORIGINE	HÉMOLYSE DES GLOBULES de mouton	AGGLUTINATION	
				Antigène H commun du groupe cholérique	Antigène O sous-groupe (cholérique) et type
Inaba . . . . .	Vieille souche Japon.	Choléra.	—	+	0,1 (Inaba).
Calcutta 2945/1.	Calcut. Mars 1935.	Choléra.	—	+	0,1 (Inaba).
Calcutta P 84/1.	Calcut. Avril 1935.	Choléra.	—	+	0,1 (Inaba).
Calcutta 81/1.	Calcut. Avril 1935.	Choléra.	—	+	0,1 (Inaba).
Calcutta P 80/1.	Calcut. Avril 1935.	Choléra.	—	+	0,1 (Inaba).
Hikojima . . . .	Vieille souche Japon.	Choléra.	—	+	0,1 (Hikojima).
Kasauli 92/1 . . .	Capt. Ahuja 1934.	Choléra.	—	+	0,1 (Ogawa).
Shillong 610 . . .	Morisson 1934.	Choléra.	—	+	0,1 (Ogawa).
El-Tor D 37 . . .	Camp. Quar. El-Tor 1935.	Pélerin sain.	+	+ — et + (1)	0,1
El-Tor D 33 . . .	Camp. Quar. El-Tor 1935.	Pélerin sain.	+	+	0,1
El-Tor D 42 . . .	Camp. Quar. El-Tor 1935.	Pélerin sain.	+	+ et —	—
N° 90 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	— et +	0,1 (Ogawa).
N° 113. . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 22 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 34 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 60 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 64 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 67 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 73 . . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—
N° 124. . . . .	Camp. Quar. 1935.	Pélerin sain.	+	—	—

(1) + — et + indique agglutination + au début, négative ensuite et + finalement; + et — indique vibron agglutinable à l'isolement et inagglutinable dans la suite; — et + indique le contraire que plus haut.

Plusieurs souches contenaient un antigène O qui n'a pas été rencontré en commun chez d'autres vibrions, constituant ainsi des souches individuelles.

Des 6 sous-groupes établis, le premier, sous-groupe O 1, renferme, d'après Gardner et Venkatraman, tous les vibrions cholériques authentiques examinés par eux et la plupart des vibrions El-Tor. En se basant sur ce fait, ces auteurs préconisent l'emploi d'un sérum O anti-sous-groupe 1 pour le diagnostic sérologique des vibrions cholériques, et l'épreuve de l'hémolyse.

Kabeshima [8], Nobechi [9], Inouye et Kakihara [10] avaient divisé les vibrions cholériques en trois variantes sérologiques : le type original ou Inaba, le type intermédiaire ou Hikojima et le type variant ou Ogawa.

Gardner et Venkatraman ont montré que ces 3 variantes rentrent dans le sous-groupe 1 et sont dues à de légères différences de l'antigène O.

Récemment, Scholtens [11, 12, 13] et Heiberg [14] ont montré que l'antigène O des vibrions du sous-groupe 1 de Gardner peut contenir un facteur A seul, ou le facteur A associé à un facteur B.

Enfin, Bruce White [15] a étudié l'antigène O des vibrions agglutinables après transformation en type rugueux.

Ces recherches lui ont montré, comme il a pu le constater chez les salmonella, qu'il existe moins de groupes O rugueux différents, que de groupes O lisses.

Les vibrions non agglutinables possèdent eux aussi les antigènes H et O.

Ces antigènes sont différents de ceux des vibrions agglutinables et sont habituellement différents chez les divers vibrions non agglutinables.

Cependant, les antigènes H ou O peuvent être parfois communs à certaines souches de vibrions inagglutinables.

Quelques recherches entreprises par moi-même sur les antigènes H et O des vibrions ont fait l'objet de communications antérieures [16 et 17]. Dans ce travail sera exposé l'ensemble de mes expériences au sujet de l'action du chloroforme sur l'agglutination H des vibrions.

## Sérums employés.

### A. — SÉRUMS DU GROUPE CHOLÉRIQUE.

1° *Sérum HO (D)* : préparé avec un mélange des quelques souches cholériques Calcutta (culture de vingt-quatre heures sur gélose chauffée à 56°). Titre HO : 4.000. Agglut. limite : 8.000 (pour v. Inaba).

2° *Sérum (2) HO (V)* : préparé avec une culture de vingt-quatre heures en bouillon de la souche Kasauli 92/1, traitée par le chloroforme. Titre HO : 1.500.

3° *Sérum (6) HO* : préparé avec une culture de trois jours

en bouillon de la souche Calcutta B. 246 (tuée par le phénol à 0,5 p. 100). Titre : 1.000 (pour v. Inaba).

4° *Sérum* (5) *HO* : préparé avec une culture de trois jours en bouillon d'une souche El-Tor D 1934, du sous-groupe O 1, tuée par le phénol à 0,5 p. 100. Titre : 500 (pour Inaba).

5° *Sérum P.H.D. 1935* : sérum anticholérique du laboratoire central de l'Hygiène publique du Caire. Titre : 5.000.

6° *Sérum P.H.D. 1936* : De même provenance que le précédent. Titre : 5.000.

#### B. — SÉRUMS POUR VIBRIONS NON AGGLUTINABLES.

7° *Sérum* (3) n° 113 : préparé avec une culture de vingt-quatre heures sur gélose du vibron non agglutinable n° 113 (émulsion tuée par le phénol à 0,5 p. 100). Titre : 2.000. Agglutination limite : 8.000.

8° *Sérum* (4) n° 113 : préparé avec une émulsion de vingt-quatre heures sur gélose du vibron non agglutinable n° 113 (émulsion extraite par le chloroforme). Titre : 1.000. Agglutination limite : 4.000.

#### *Suspensions et agglutinations.*

Les émulsions dans l'eau physiologique provenant des cultures de vingt-quatre heures sur gélose étaient employées, soit comme telles à l'état frais (émulsions HO), soit tuées par le phénol à 0,5 p. 100, et après vingt-quatre heures, dilué à 0,3 p. 100 pour la conservation (émulsion HO), soit après ébullition de cinq à quinze minutes (émulsions O), soit enfin après traitement par le chloroforme (émulsions donnant l'agglutination H).

Pour traiter les émulsions par le chloroforme, ce dernier était ajouté à la proportion d'environ 1,5 p. 100 et mélangé par une agitation modérée à la main (et non à l'agitateur mécanique qui pourrait nuire à l'agglutination H) répétée quatre à cinq fois dans l'espace d'une heure.

Les émulsions ainsi extraites, essayées dans l'agglutination,

devaient toujours être plus denses que les émulsions ordinaires, sinon les résultats étaient difficiles à lire.

Les tubes à agglutination étaient placés à l'étuve à 37° pendant quatre heures (première lecture) et puis à la température du laboratoire toute la nuit (lecture finale).

### Expériences personnelles.

*Agglutination flagellaire « H » des vibrions après traitement au chloroforme (et à l'éther).*

#### 1° AGGLUTINATION PAR LES SÉRUMS ANTICHOLÉRIQUES.

Bruce White [18, 19 et 20], dans une série de communications, a montré que l'agglutination spontanée, dans les électrolytes des microbes à l'état rugueux, était supprimée par extraction par l'alcool, l'éther ou le chloroforme. De même, il a montré que l'agglutination spécifique du B. de Sonne par le sérum anti-Sonne s'atténuait considérablement après pareille extraction. Conformément à ce que Bruce White a observé pour les microbes à l'état rugueux et pour le B. de Sonne, j'ai montré antérieurement (*loc. cit.*) que le chloroforme atténue considérablement l'agglutination somatique O des vibrions par le sérum spécifique, au point que, seule, une agglutination H se manifeste après action des sérums H O sur les émulsions traitées par ce dissolvant (sauf pour les très grandes concentrations).

Au cours de ces recherches sur l'agglutination O, après extraction (1) par le chloroforme, j'ai remarqué que tandis que l'agglutinabilité O baissait, par contre l'agglutination H non seulement persistait, mais augmentait très souvent considérablement après traitement par ce dissolvant.

Ces constatations m'ont amené à étudier plus amplement ce phénomène et à rechercher une influence éventuelle de l'extraction sur l'agglutination H des vibrions non agglutinables.

(1) Le terme « extraction » est employé, étant donné qu'une pareille action est très probable, comme il sera exposé plus loin.



TABLEAU I. — Vibrions agglutinables et sérums du groupe cholérique.

VIBRIONS	DILUTIONS										Contrôle Eau physiologique
	250	500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000		
a) <i>Sérum HO (D) T. : 4.000 :</i>											
(1)											
Shillong 610. Extr.				++	++	++	++	++	++	Tr.	—
Shillong 610. Frais				++	++	++	++	++	++	—	—
Calcutta 2945/1. Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
Calcutta 2945/1. Frais				++	++	++	++	++	++	—	—
Hikojima. Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
Hikojima. Frais				++	++	++	++	++	++	—	—
Kasauli 92/1. Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
Kasauli 92/1. Frais				++	++	++	++	++	++	—	—
Inaba. Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
Inaba. Frais				++	++	++	++	++	++	—	—
Calcutta P84/1. Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
Calcutta 84/1. Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
El Tor D 33 Extr.				++	++	++	++	++	++	—	—
b) <i>Sérum (5) T. : 500 :</i>											
Inaba. Extr.	Tr.	Tr.	+	++							—
Inaba. Phén.	++	++	—	—							—
c) <i>Sérum (6) T. : 1.000 :</i>											
Inaba. Extr.	++	++	++	++	++	++	++	++	++		—
Inaba. Phén.	++	++	++	—	—	—	—	—	—		—

(1) L'absence du signe + ou — indique que l'agglutination n'a pas été essayée dans la dilution en question.

(1) L'absence du signe + ou — indique que l'agglutination n'a pas été essayée dans la dilution en question.



TABLEAU III. — Contrôle (3 sérums non spécifiques de lapins).

SOUCHES	25	500	1.000	2.000	CONTRÔLE Eau physiologique
—	—	—	—	—	—
Inaba extr. . . . .	—	»	—	—	—
Inaba frais . . . . .	—	»	—	—	—
Calcutta P84/1. Extr. .	—	»	—	—	—
Calcutta 81/1. Extr. . .	—	»	—	—	—
El-Tor D33. Extr. . . .	—	»	—	—	—
N° 22. Extr. . . . .	»	—	»	—	—
N° 113. Ext. . . . .	»	—	»	—	—

Dans les tableaux I et II se trouvent résumés quelques-uns des résultats obtenus. Le tableau III contient les résultats des contrôles effectués avec des sérums non spécifiques.

Le tableau I montre une agglutination H beaucoup plus accentuée après extraction chloroformique.

La lecture du tableau II montre l'agglutination H frappante qui apparaît, chez les vibrions inagglutinables, après extraction.

Dans les cas des sérums (5) et (6) cette agglutination n'est pas nette. Peut-être cela tient-il au fait que ces sérums ont été préparés avec des souches de trois jours en bouillon.

En opérant avec des émulsions extraites et de sérums HO j'ai observé une agglutination H pure. Celle-ci se présente sous forme de gros flocons très lâches. Il faut examiner les tubes attentivement et les agiter doucement en observant à la loupe. Après agitation, les flocons se reforment difficilement.

Les tubes étaient laissés à l'étuve à 37°, quatre heures, ou mieux encore, toute la nuit.

Après quatre heures déjà, dans les premiers tubes, l'agglutination H pouvait se manifester; cependant, dans les grandes dilutions, la réaction était tardive et se complétait après vingt-quatre heures.

Il était souvent difficile de noter le tube limite où l'agglutination était complète. Parfois, le liquide surnageant conservait un léger trouble, ne se clarifiant complètement que dans les tout premiers tubes.

L'agglutinabilité H des émulsions extraites par le chloro-

forme se conserve longtemps. Les souches Inaba et Kasauli 92/1, après contact avec le chloroforme pendant cinquante jours, ont donné une agglutination floconneuse complète au 10.000 avec le sérum H O. (D). Titre : 4.000.

Enfin l'éther, essayé sur les souches Inaba et Kasauli 92/1 et sur quelques vibrions non agglutinables, a montré la même activité que le chloroforme.

Ajoutons, pour terminer ce chapitre, que tous les vibrions non agglutinables essayés ont été isolés à El-Tor.

## 2° AGGLUTINATION PAR LES SÉRUMS PRÉPARÉS AVEC LES VIBRIONS INAGGLUTINABLES.

L'expérience inverse, à savoir l'action des sérums préparés au moyen des souches inagglutinables, sur les vibrions (agglutinables ou non) extraits a été réalisée.

Quelques-uns des résultats obtenus sont exposés dans les tableaux IV et V.

TABLEAU IV. — Sérum (3) n° 113.

SOUCHES	DILUTIONS							
	250	500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000
N° 113. Extr..	++++	++++	++++	++++	++++	+++	Tr.	—
N° 113. Frais.	++++	++++	++++	++++	+++	Tr.	—	—
Inaba. Extr..	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	—
Inaba. Frais.	—	—	—	—	—	—	—	—
								Contrôle Eau physiologique

Comme on le voit, les sérums des vibrions inagglutinables agglutinent les vibrions cholériques traités par le chloroforme. De même, ils agglutinent les émulsions chloroformées d'autres vibrions inagglutinables avec les émulsions fraîches dont ils ne réagissent pas.

L'agglutination des émulsions chloroformées, comme cela est mentionné plus haut, est tardive, floconneuse et très lâche,



TABLEAU V.

	SÉRUM (3) n° 113		SÉRUM (4) n° 113 500	SÉRUM HO (D)		FAU physiologique
	125	500		250	1.000	
N° 34. Extr. . . . .	++++	++++	++++	++++	++++	—
N° 34. Frais. . . . .	—	—	—	—	—	—
N° 90. Extr. . . . .	++++	++++	++++	++++	++++	—
N° 90. Frais. . . . .	—	—	—	++++	++++	—
N° 22. Extr. . . . .	++++	++++	++++	++++	++++	—
N° 22. Frais. . . . .	++++	++++	++++	—	—	—
El-Tor D 42. Extr. . . .	++++	++++	++++	++++	++++	—
El-Tor D 42. Frais. . .	++++	++++	++++	—	—	—
El-Tor D 37. Extr. . . .	++++	++++	++++	++++	++++	—
El-Tor D 37. Frais. . .	Tr.	—	—	++++	++++	—
Kasauli 92/1. Extr. . .	++++	++++	++++	++++	++	—
Kasauli 92/1. Frais . .	—	—	—	++++	++++	—
Calcutta P 80/1. Extr.	++++	++++	++++	++	++	—
Calcutta P 80/1. Frais .	—	—	—	++++	++++	—

présentant ainsi les caractères typiques de l'agglutination flagellaire des vibrions.

Les trois souches, 113, 22 et D 42 qui, d'après le tableau V, présentent une communauté d'antigène II, ont été soumises à l'ébullition durant quelques minutes et ensuite essayées avec le sérum (3) n° 113, afin de rechercher une communauté éventuelle de leur antigène O. Les résultats ont montré l'existence d'un antigène O commun chez ces trois souches.

#### EXPÉRIENCES D'ABSORPTION.

Pour être significatives, les expériences d'absorption doivent être croisées et exécutées au complet, réalisant le « miror-test ».

Il était intéressant de voir le résultat de pareilles absorptions sur l'agglutination des souches, extraites par le chloroforme, ou non.

A cet effet, 12 c. c. 5 des dilutions du sérum H O (D) au 250 et du sérum (3) n° 113 au 125 ont été absorbés par le produit de culture de vingt-quatre heures sur gélose, de 6 boîtes de Petri.

TABLEAU VI.

	500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	CONTRÔLE
--	-----	-------	-------	-------	-------	--------	----------

## 1° SÉRUM HO (D).

a) Absorbé par culture *Inaba* fraîche :

<i>Inaba</i> . Extr..	—	—	—	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Phén.	—	—	—	—	—	—	—
N° 113. Extr.	—	—	—	—	—	—	—
N° 113. Phén.	—	—	—	—	—	—	—

## b) Absorbé par culture n° 113 fraîche :

<i>Inaba</i> . Extr..	++++	++++	—	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Phén.	++++	++++	+++	—	—	—	—
N° 113. Extr.	—	—	—	—	—	—	—
N° 113. Phén.	—	—	—	—	—	—	—

## c) Non absorbé :

<i>Inaba</i> . Extr..	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
<i>Inaba</i> . Phén.	++++	++++	+++	+	—	—	—
N° 113. Extr.	+	+	++++	++++	++++	+	—
N° 113. Phén.	—	—	—	—	—	—	—

	250	500	1.000	2.000	4.000	8.000	CONTRÔLE
--	-----	-----	-------	-------	-------	-------	----------

## 2° SÉRUM (3) N° 113.

## a) Absorbé par culture n° 113 fraîche :

N° 113. Extr.	—	—	—	—	—	—	—
N° 113. Phén.	—	—	—	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Extr..	—	—	—	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Phén.	—	—	—	—	—	—	—

b) Absorbé par culture *Inaba* fraîche :

N° 113. Extr..	+	—	—	—	—	—	—
N° 113. Phén.	++++	++++	Tr.	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Extr..	—	—	—	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Phén.	—	—	—	—	—	—	—

## c) Non absorbé :

N° 113. Extr.	++++	++++	++++	++++	++++	Tr.	—
N° 113. Phén.	++++	++++	+	—	—	—	—
<i>Inaba</i> . Extr..	++++	++++	++++	++++	+++	Tr.	—
<i>Inaba</i> . Phén.	—	—	—	—	—	—	—

Les cultures employées pour l'absorption étaient à l'état frais dans une série d'expériences, et préalablement traitées par le chloroforme dans une autre série.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VI.

Des expériences tout à fait superposables, effectuées avec des sérums absorbés par des cultures préalablement extraites par le chloroforme, ont donné des résultats tout à fait similaires à ceux exposés au tableau VI. Pour ce motif elles n'y figurent pas.

Il en résulte que les vibrions frais ou extraits absorbent complètement toutes les agglutinines des sérums correspondants homologues.

En outre, les vibrions non agglutinants frais ou extraits absorbent complètement les agglutinines des sérums du groupe cholérique pour leurs propres émulsions (vibrions non agglutinables) extraites, et vice versa.

De même, les vibrions non agglutinables (et vice versa, pour les vibrions agglutinables) absorbent une grande partie, mais pas toute, des agglutinines, des sérums du groupe cholérique, pour les émulsions extraites du groupe cholérique, et enfin laissent pratiquement intactes les agglutinines ordinaires des sérums du groupe cholérique pour les émulsions cholériques fraîches (ou phénolées).

#### ESSAIS DE RÉIMPRÉGNATION.

Bruce White a constaté qu'en réimprégnant les émulsions traitées par l'alcool avec les substances extraites, les bactéries rough regagnaient leur propriété d'agglutination O spontanée aux électrolytes, disparue par l'extraction. Des observations analogues mais moins nettes ont été faites par lui pour ce qui concerne l'agglutination spécifique aux sérums.

J'ai fait antérieurement quelques essais déjà publiés, afin de restituer l'agglutination O des vibrions par réimprégnation avec les substances extraites par le chloroforme, et cela avec des résultats négatifs.

Quelques nouveaux essais ont été faits en évaporant le chloroforme ayant extrait les souches Inaba et n° 113. Après

l'évaporation, les produits éventuels extraits ont été redissous en partie dans l'eau salée et en partie dans l'alcool méthylique absolu, dilué par la suite de façon que sa concentration finale ne dépasse pas 5 p. 100. Les substances éventuellement extraites et redissoutes ont été ajoutées dans les tubes d'agglutination à une concentration deux fois supérieure à celle d'avant l'extraction.

Comme antérieurement, l'agglutination O des vibrions, très réduite par l'extraction, n'a pas été restituée par la réimprégnation.

La même série des réimprégnations a été faite afin de rechercher l'action inhibitrice éventuelle de ces opérations sur l'agglutination H.

A cet effet, des cultures Inaba et n 113 soumises à l'extraction ont été additionnées des substances extraites correspondantes. Après cela, leur sensibilité a été éprouvée par les sérums H O (D) et (3) n° 113, en même temps que des cultures témoins extraites mais pas réimprégnées.

Dans les deux séries d'émulsions extraites, les réimprégnées et les témoins, il n'y a pas eu de différence sensible de l'agglutination. En d'autres termes, l'accentuation de l'agglutination H des vibrions agglutinables et l'apparition d'une agglutination H, par les sérums du groupe cholérique, chez les vibrions non agglutinables extraits, n'est pas influencée par la réimprégnation avec les substances extraites.

### Discussion.

L'action très curieuse du chloroforme sur l'agglutination H des vibrions a été confirmée par l'étude des nouveaux sérums et par des expériences croisées.

Le mode intime de cette action du chloroforme n'a pas été décelé d'une façon certaine.

On peut se demander si le chloroforme, par une réaction quelconque, met en évidence un nouvel antigène inexistant auparavant, ou si tout simplement il permet à un antigène déjà présent de réagir avec certaines agglutinines.



Si l'on tient compte que le chloroforme est un dissolvant de premier ordre des graisses, et que l'éther, chimiquement différent du chloroforme, mais ayant la même propriété physique de dissoudre les lipoides, agit de la même façon que le chloroforme, il semble très probable que c'est une simple dissolution et non une réaction chimique qui se passe. Cela rend probable la supposition que l'antigène mis en évidence préexiste et ne résulte pas d'une réaction chimique. D'ailleurs, de nombreux auteurs ont montré l'importance des lipoides dans la constitution antigénique des bactéries et dans leurs réactions immunologiques. C'est ainsi que récemment Boivin et Mesrobian [21 et 22] ont attribué une importance considérable à un complexe lipido-glucidique de l'antigène somatique. De même, Bruce White a montré que le chloroforme, l'éther et l'alcool suppriment l'agglutination somatique O par une action de dissolution.

D'autre part, la production d'agglutinines pour l'antigène extrait, par inoculation à l'animal de l'antigène frais, démontre que l'antigène, mis en évidence après extraction, préexiste en réalité. De même l'absorption par les vibrions à l'état frais des agglutinines pour les vibrions extraits est une autre preuve de l'existence de l'antigène avant l'extraction.

Les expériences d'absorption montrent la différence des agglutinines pour les vibrions agglutinants et non agglutinants à l'état frais. Par contre, il semble que les agglutinines, pour les vibrions extraits, soient communes, puisque des vibrions frais ou extraits d'une espèce absorbent du sérum de l'autre espèce, les agglutinines pour leur propre émulsion extraite, et en très grande partie les agglutinines pour l'émulsion extraite de l'autre espèce (correspondante au sérum). De plus, l'injection à l'animal d'un vibron agglutinable fait apparaître des agglutinines pour les vibrions non agglutinables extraits et vice versa.

De ce qui précède, on voit que les vibrions agglutinables (l'inverse est vrai avec les vibrions non agglutinables) à l'état frais, en plus des agglutinines pour les vibrions agglutinables frais, produisent des anticorps pour les vibrions non agglutinables qui les fixent sans en être agglutinés à l'état frais.

L'agglutination ne se présente que si ces vibrions ont été extraits au préalable.

Tout se passe comme s'il y avait une substance préparant ces agglutinines communes à agir et que le chloroforme supprime.

### Conclusions.

1° L'extraction par le chloroforme ou l'éther accentue considérablement l'agglutination flagellaire H des vibrions du groupe cholérique par les sérums anticholériques, *et fait apparaître une agglutination H considérable par ces sérums chez les vibrions non agglutinables.*

2° L'extraction par le chloroforme fait apparaître une agglutination H très marquée par les sérums des vibrions non agglutinables :

a) Chez les vibrions du groupe cholérique ;

b) Chez d'autres vibrions non agglutinables, ayant un antigène H différent du vibron non agglutinable ayant servi dans la préparation du sérum.

3° Les expériences d'absorption ont montré qu'il existe des agglutinines différentes correspondantes aux antigènes frais des vibrions agglutinables et non agglutinables, et que les agglutinines correspondantes à l'antigène agglutinable seulement après extraction, semblent être communes.

4° Le chloroforme ne donne pas lieu à la production d'un nouvel antigène, mais permet à un agglutinogène déjà existant de s'agglutiner.

5° La réimprégnation des émulsions traitées par le chloroforme avec les substances extraites ne leur restitue pas leurs propriétés initiales d'agglutination.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALTEANU (I.). *J. Path. Bact.*, **29**, 1926, p. 251.
- [2] SHOUSHA (A. T.). *Journ. Egypt. Med. Assoc.*, 1931, p. 438.
- [3] ABDOOSH (Y. B.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **13**, 1932, p. 42.
- [4] GOHAR (M. A.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **13**, 1932, p. 371.
- [5] BRUCE WHITE (P.). *Suppl. Bull. Off. Int. Hyg. Publ.*, **26**, 1934, N° 7, p. 73.

- [6] HEIBERG (B.). *Thèse Nyt*, 1935, Nordish. Forlag, Arnel'd Busck.
- [7] GARDNER (A. D.) et VENKATRAMAN (K. V.) *Journ. Hyg.*, **35**, 1935, p. 262.
- [8] KABESHIMA (I.). *Nippon-Eisei-Gakkai Zasshi*, **9**, 1913, N° 1.
- [9] NOBECHI (K.). *Sci. Rep. Gov. Inst. Inf. Dis.*, Tokio, **2**, 1923, p. 43.
- [10] INOUE et KAKIHARA. *Sci. Rep. Gov. Inst. Inf. Dis.*, Tokio, **4**, 1925, p. 47.
- [11] SCHOLTENS (R. Th.). *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 420.
- [12] SCHOLTENS (R. Th.). *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 68.
- [13] SCHOLTENS (R. Th.). *Ces Annales*, 1936.
- [14] HEIBERG (B.). *Journ. Hyg.*, **36**, 1936, p. 118.
- [15] BRUCE WHITE (P.). *Journ. Hyg.*, **35**, 1935, p. 347.
- [16] VASSILIADIS (P. Ch.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, N° 11, p. 1069.
- [17] VASSILIADIS (P. Ch.). *Journ. Egypt. Med. Assoc.*, **19**, 1936, p. 247.
- [18] BRUCE WHITE (P.). *Med. Rev., Counc. Spec. Rep.*, 1926, séries N° 103
- [19] BRUCE WHITE (P.). *Journ. Path. Bact.*, **30**, 1927, p. 113.
- [20] BRUCE WHITE (P.). *Journ. Path. Bact.*, **31**, 1928, p. 423.
- [21] BOIVIN et MESROBEANU. *Revue d'Immunologie*, 1935.
- [22] BOIVIN et MESROBEANU. *Revue d'Immunologie*, 1936.

**DESTIN DE LA FLORE BACTÉRIENNE  
PENDANT LA MÉTAMORPHOSE  
DE LA MOUCHE A VIANDE (*CALLIPHORA ERYTROCEPHALA*)**

par N. BALZAM.

*(Institut de physiologie végétale de l'Université J.-P.  
à Varsovie.)*

Les larves de nombreux insectes se nourrissent d'aliments contenant des quantités énormes de microbes. Il s'agit de savoir quel est le destin de ces microbes au cours de la métamorphose pendant laquelle l'intestin larvaire est, soit complètement, soit, au moins, en partie, détruit et remplacé par l'organe correspondant de l'imago. Il est vrai que la destruction des organes ne va pas aussi loin que le supposaient les auteurs plus anciens. Il est hors de doute, toutefois, que, chez les mouches, par exemple, les parois de l'intestin, du moins dans certaines de ses portions, perdent leur étanchéité, subissent une destruction phagocytaire et se dispersent dans la cavité générale (Perez, 1910).

Et les microbes, comment se comportent-ils pendant ces transformations complexes? Passent-ils dans le corps de l'insecte parfait en farcissant ses tissus et ses organes pour procéder à leur action destructrice habituelle après la mort de l'insecte? Ne trouvent-ils des conditions plus favorables que dans ses organes digestifs et ne se développent-ils que là? Ou bien ne passe-t-il dans le corps de l'insecte adulte que les microbes sporulés ou quelques espèces bien déterminées? Et en dernier lieu, peut-on supposer que tous les microbes périssent pendant ou avant la métamorphose et que l'organisme de l'insecte adulte est exempt de microbes, si toutefois il ne se réinfecte pas ultérieurement?

Comme premier sujet expérimental, nous avons choisi la



mouche à viande, *Calliphora erythrocephala*. Notre choix fut déterminé par la facilité d'élevage de cet insecte et par l'existence des nombreux travaux ayant trait, d'une part, aux processus histologiques pendant la métamorphose des mouches (Perez, 1910), et, d'autre part, à cette question de si grande portée pratique qu'est le transport des germes par ces insectes à travers les stades successifs du développement.

La longue série de ces travaux débute par le mémoire de Daniels (1904), d'après lequel les microbes provenant des matières fécales humaines ne passent pas dans l'organisme des mouches adultes. A l'opposé de cette opinion, Cao (1906) constate, que *Bac. anthracis*, *Bact. prodigiosum*, *Bact. fluorescens liquefaciens*, *Bac. Kiel.*, *Sarcina aur.*, *Staph. pyog.*, *Oïdium*, ingérés par la larve, non seulement passent à l'imago, mais que ce passage augmente sensiblement leur virulence. En se basant sur les constatations de Cao, Galli Valerio (1910) prétend qu'un tel passage expliquerait la recrudescence, à des périodes espacées, de certaines épidémies. Indépendamment de Cao, Faichnie (1909) relève que les microbes provenant de larves élevées sur des matières fécales typhoïdiques, peuvent passer, et passent en effet, dans l'intestin de l'imago. Bacot (1911), reprenant les expériences de Faichnie, établit que *Bact. pyocyaneum* passe des larves aux chrysalides et aux formes adultes. La même année, a paru le mémoire de Ledingham, qui constate que, dans les conditions normales, les germes de la typhoïde ne passent pas à l'intérieur de la mouche, étant supplantés par la flore banale de la larve. Dans des conditions expérimentales (désinfection des œufs), on les retrouve à l'intérieur des pupes, mais probablement ils ne peuvent s'y multiplier et périssent peu à peu. Tebbut (1912) arrive aux mêmes résultats dans ses expériences sur le bacille dysentérique. Cet auteur affirme que *Bac. morgani*, ingéré avec des aliments ou infectant la surface des œufs, se retrouve, dans un certain nombre de cas, chez les pupes et les insectes parfaits. Un certain pourcentage de chrysalides, selon Tebbut, est stérile, ce qui prouve qu'une destruction des microbes survient au cours de la métamorphose. Krontowski (1913), se basant sur les résultats de ses examens sérologiques, affirme que le bacille

dysentérique ne passe pas à l'insecte adulte ni chez *Musca domestica*, ni chez *Sarc. carnaria*, *Sarc. mortuorum* et *Lucilia caesar*. Nicholls (1912) observe une destruction graduelle des microbes pendant la métamorphose des mouches du genre *Sarcophaga* et *Sarcophagula*. Les mouches qui viennent d'éclore sont probablement, selon cet auteur, stériles et ne se réinfectent que plus tard (infection secondaire). Alessandrini et Sampietro (1912) constatent que *Vibrio cholerae* périt chez la mouche domestique. Graham-Smith (1914), auquel nous devons les recherches les plus complètes sur le transport des germes par les mouches, constate que : 1° Les mouches à viande (*Calliphora*, *Lucilia*) nourries à l'état larvaire sur le cadavre d'un animal charbonneux ne sont pas infectées par *Bac. anthracis* ; 2° Un pourcentage considérable de mouches domestiques et de mouches à viande, provenant de larves, contaminées avec les spores de *Bac. anthracis*, est infecté ; 3° Parmi les microbes non sporulés, seules les espèces qui s'adaptent aux conditions régnant dans l'intestin larvaire, et quelques microbes qui ne font pas fermenter la lactose peuvent survivre assez longtemps pour se retrouver chez l'insecte adulte. Les organismes du type *Bact. typhi*, *Bact. enteritidis* et *Bact. prodigiosum* survivent rarement. Glaser (1923) affirme que l'intestin de la mouche domestique venant d'éclore constitue un véritable réservoir de microbes (non spécifiques), tandis que *Lyperosia irritans* est exempt de bactéries. En revanche, Wollman (1912), dans ses expériences sur les mouches aseptiques, contaminées avec des cultures pures de *Bac. anthracis*, *Bact. typhi*, *Bact. shiga*, constate la disparition complète des microbes ingérés ; mais les microbes observés par Wollman n'appartiennent pas à la flore normale de l'intestin larvaire. Les expériences de cet auteur sur la mouche à viande présentent des résultats moins nets en raison des difficultés de stérilisation de l'extérieur des pupes (nourriture grasse et gluante). De même Muzzarelli (1925) ne retrouve pas chez les insectes adultes de microbes englobés par les larves. Cette même année, Petragani prouve que *Bact. typhi*, *Vibrio cholerae*, *Bact. tuberculosis*, etc., absorbés par les larves passent en quantités énormes dans l'intestin de la mouche après l'éclosion.

En 1926, Leach obtient des résultats semblables dans ses expériences sur la mouche *Phorbia fusciceps*. Selon cet auteur, les larves de *Phorbia* renferment une flore bactérienne très riche, constituée de divers genres, parmi lesquels se trouvent également des microbes pathogènes des plantes. Les microbes absorbés par les larves passent dans l'intestin des pupes et des formes adultes. Les œufs de *Phorbia* ne contiennent pas de microbes, mais leurs enveloppes sont abondamment infectées. En se basant sur les résultats de Leach, Buchner (1930) et Schwartz (1935) prétendent même qu'il existe un type spécial de symbiose entre les insectes et les microbes, qu'ils dénomment « type *Phorbia* ». En 1933, paraît un second travail de Leach sur la mouche *Hylomyia cilicrura*, exécuté, à la différence de tous les autres, à l'aide des méthodes histologiques. Cette fois encore, Leach retrouve des microbes dans l'intestin de la mouche fraîchement éclos. Le dernier travail sur ce sujet est le mémoire de Canio Russo (1931), qui relève que les larves de mouches nourries sur le cadavre d'un animal pestiféré, donnent des mouches fortement infectées par *Bact. pestis*.

Cette revue, contenant toutes les références bibliographiques recueillies par nous, indique que la littérature ne peut nous fournir aucune idée sur les problèmes qui nous intéressent. Ayant cru que la raison des divergences d'opinions et la confusion des résultats obtenus par les auteurs précédents résidait probablement dans des erreurs de méthode, nous avons porté une attention toute particulière à l'élaboration d'une technique, assurant l'éclosion de la mouche dans des conditions excluant toute pénétration des microbes de l'extérieur.

A la différence des recherches de la plupart des auteurs précédents, les nôtres portaient avant tout sur des espèces de bactéries appartenant à la flore normale de l'intestion larvaire.

### Méthodes employées.

#### I. — STÉRILISATION DES PUPES.

La stérilisation de l'extérieur des pupes (*puparium*) ayant pour but d'assurer l'éclosion des mouches dans des conditions

excluant toute réinfection, constituait l'élément essentiel de toutes ces expériences. Après une série d'essais dans lesquels on étudiait aussi bien le degré de désinfection de l'extérieur des pupes que leur résistance à l'action des désinfectants, on s'est arrêté à la méthode de stérilisation suivante :

On rinçait les larves, dont l'intestin ne contenait plus de viande, à l'eau de robinet, dans une petite passoire métallique; on les séchait avec du papier buvard et on les mettait pendant vingt-quatre heures dans des boîtes en bois bien propres. Après ce laps de temps, on répétait cette opération, mais cette fois on les séchait sur du papier buvard stérile et on les rangeait dans des boîtes stérilisées. On refaisait cette manœuvre afin de débarrasser l'extérieur des larves des matières fécales excrétées après le premier lavage; la pupation des larves avait lieu dans ces boîtes. Après la pupation de la plupart des larves, on rejetait les sujets « arriérés ». Pour éviter la dessiccation des pupes, on plaçait dans les boîtes d'élevage un petit bocal rempli d'eau. Un jour avant l'éclosion de l'insecte parfait, on procédait à la stérilisation (à la température de 23°, le développement des pupes dure généralement douze jours). A cette époque, probablement grâce à la formation d'une petite couche d'air séparant la nymphe de la surface intérieure du puparium, les pupes se distinguent par leur plus grande résistance à l'action des désinfectants. Cette résistance est en général considérable et presque illimitée par rapport aux substances n'humectant pas ou humectant mal la surface extérieure des enveloppes (solution aqueuse de sublimé, par exemple). Le plus efficace et le moins nocif de ces désinfectants est sûrement le perhydrol de Merck (30 p. 100  $H_2O_2$ ) appliqué pendant deux heures et demie. Il ne donne pas de produits gazeux nocifs diffusant à l'intérieur des pupes (comme par exemple l'eau bromée), n'arrête pas le développement de la nymphe (pas d'asphyxie), nettoie mécaniquement, humecte suffisamment la surface extérieure et détruit la plupart des germes enfermés entre les segments du puparium. La plaque de gélose nutritive, frottée avec la surface extérieure de la pupa stérilisée au perhydrol (et soigneusement rincée à l'eau stérilisée) restait stérile. Dans certaines expériences, après le bain de perhydrol, on employait de plus, pendant un quart d'heure, la solution de  $HgCl_2$  à 2 p. 100. Le bain d'eau bromée saturée, appliqué pendant deux minutes, donne des résultats moins bons, car, durant ce laps de temps, le brome ne détruit pas les germes dissimulés entre les segments, et l'emploi plus prolongé de ce désinfectant tue la future imago.

Après le bain de perhydrol (lors du lavage, on secouait de temps en temps le bocal avec du perhydrol pour humecter uniformément la surface des pupes surnageant dans le liquide), on transportait les pupes à l'aide d'une pince stérile dans une boîte de Petri, remplie d'eau stérilisée. Ce rinçage fini, on les plaçait pour sécher dans des boîtes stérilisées à l'air chaud. Le fond de ces récipients étant recouvert de papier buvard, les pupes y séchaient vite. On ne saurait négliger l'importance de cette opération, car le séchage minutieux paralyse le développement ultérieur des germes qui, introduits dans les orifices des trachées ou sous les segments de l'enveloppe, n'ont pas été détruits par le perhydrol.



Les pupes soigneusement séchées étaient transférées dans des éprouvettes sèches qu'on venait de stériliser à l'air chaud. Ceci fait, on recouvrait d'une cloche en verre le panier, où l'on rangeait les éprouvettes, afin de protéger leurs tampons de coton contre la poussière et les germes. On rangeait les éprouvettes les tampons en bas, car les mouches nouvellement écloses se dirigent vers le haut et souvent s'introduisent sous le tampon de coton.

Lorsqu'on voulait stériliser un grand lot de pupes à la fois, on les mettait dans une petite cuillère à infuser du thé, dont le couvercle s'ouvre et se ferme au moyen d'un manche à ressort. On introduisait cette cuillère remplie de pupes, successivement dans les bocaux contenant du perhydrol puis de l'eau stérilisée. On étalait ensuite les pupes stérilisées et rincées sur une feuille de papier buvard stérile. Après les avoir bien séchées, on les faisait passer dans les éprouvettes, en s'aidant de tampons de coton tenus à la pince. Pour éviter l'infection de l'air, on effectuait aussi bien les expériences portant sur un grand nombre d'individus que d'autres opérations plus compliquées de cette série dans l'appareil de Hansen. Ce dernier est une boîte vitrée munie de deux orifices pour les mains de l'expérimentateur où l'on introduit de l'extérieur de la vapeur d'eau qui, à la température du laboratoire, se condense sur toutes les particules suspendues dans l'air et détermine ainsi leur chute rapide. De ce fait, l'air à l'intérieur de la boîte se débarrasse mécaniquement, après un court laps de temps, de tous les microbes, ce qui permet d'ouvrir sans risque les récipients contenant de la nourriture et d'exécuter les opérations requises.

Tous ces modes de stérilisation ne nuisent nullement aux futures imagos. Leur éclosion se fait normalement ; presque toutes sortent indemnes de cette opération, et bien rares sont les individus dont les ailes sont abîmées par l'action du perhydrol.

## II. — EXAMEN DES MOUCHES.

On effectuait deux sortes d'expériences sur les mouches écloses dans les tubes. Dans une série d'entre elles, on immergeait les mouches vivantes dans des tubes à essai avec de la gélatine nutritive (chauffée à 37°). Dans l'autre, on triturait les mouches dans 1 c. c. 5 à 2 cent. cubes d'eau distillée stérilisée, en les écrasant (à l'aide d'une pince stérile) contre les parois du tube. On versait l'émulsion obtenue dans une boîte de Petri et on la mélangeait avec de la gélose nutritive à 46-47° (1). Il va de soi que cette opération faisait baisser instantanément la température de la gélose. Avant de mélanger la mouche écrasée avec de la gélose, on en prenait une goutte pour l'ensemencer sur la gélose nutritive. Le volume de cette gouttelette (anse standardisée)

(1) Composition de cette gélose : 1 gr. 5 d'agar-agar, 0 gr. 6 de peptone et 1 gramme de glucose pour 100 cent. cubes de bouillon de viande.

était le 1/1.000 environ du volume de l'émulsion versée dans la première boîte.

Les expériences du premier type nous permettaient de constater le fait même de l'infection ou de la stérilité (quand cette stérilité était absolue). Les expériences du second type établissaient en plus le degré d'infection ; autrement dit, elles déterminaient, approximativement il est vrai, la quantité des microbes infectant le corps de la mouche. La trituration des mouches dans de l'eau et l'examen de la pâte ainsi obtenue se faisaient à l'air, à l'aide des techniques bactériologiques courantes, mais l'immersion des mouches vivantes dans de la gélatine nutritive s'effectuait toujours dans la boîte aseptique. Lors du transfert des mouches dans des tubes de gélatine nutritive, on évitait d'y laisser tomber des fragments de l'enveloppe chitineuse des pupes. Ceci est considérablement facilité par le fait que les mouches introduites dans des récipients étroits se dirigent plutôt vers le haut (indépendamment de la direction de la lumière). On ranimait celles qui restaient apathiques au fond, en secouant légèrement le tube. Pour les faire passer d'un tube à l'autre, on plaçait le tube à recueillir l'insecte toujours au-dessus, contre l'orifice du tube contenant la mouche. On mettait à l'étuve (à 37°) les tubes avec de la gélatine contenant les mouches vivantes, et, lorsque la gélatine se liquéfiait, on y immergeait les mouches en agitant les tubes. Ceci fait, on solidifiait la gélatine.

Les diverses modifications de ces deux types d'expériences, de même que la technique de dissection de l'intestin des mouches, seront décrites dans la partie expérimentale de ce mémoire.

### III. — EXPÉRIENCES SUR DES LARVES

CONTAMINÉES PAR DES CULTURES PURES DE DIFFÉRENTS MICROBES.

Une partie de ces expériences était effectuée sur les larves nourries de cultures pures de différentes espèces de microbes. A cette fin, il fallait d'abord obtenir des larves aseptiques et les infecter ensuite avec des microbes en culture pure. La question de l'élevage aseptique est intéressante en elle-même et a une grande portée dans les divers domaines de la physiologie des insectes. Dernièrement, grâce à l'utilisation de larves de diverses espèces de mouches à viande dans le traitement des plaies infectées, la technique d'élevage aseptique a trouvé son application même dans la pratique médicale (Brumpton, 1933). Aussi a-t-on publié toute une série de travaux concernant les différentes méthodes de stérilisation pratique des œufs de mouches. On y utilisait des solutions aqueuses et alcooliques de sublimé, du lysol à 3 p. 100 et de la solution de formol

à 10 p. 100. Dans notre travail, nous nous sommes servi d'une méthode qui diffère quelque peu de toutes les autres : après la stérilisation, on transporte sur le milieu nutritif non pas les œufs, mais les larves fraîchement écloses ; séparant les larves de leurs enveloppes contaminées et insuffisamment stérilisées, on écarte toute possibilité de réinfection et l'on augmente considérablement le nombre d'individus stériles.

Pour désinfecter les œufs, on utilisait la solution de  $\text{HgCl}_2$  à 0,5 p. 100. C'est un assez fort désinfectant ; on ne s'en servait cependant pas immédiatement après la ponte, mais deux heures avant l'éclosion de larves au moment de leur plus grande résistance (Hobson, 1932). Cette résistance est probablement déterminée en partie par la formation d'une couche de gaz tout autour de l'embryon (ce qui entrave la diffusion des liquides à l'intérieur de l'œuf), et en partie pour d'autres raisons, car ce sont justement les larves fraîchement écloses qui font preuve d'une plus grande résistance à l'action des désinfectants (ces larves supportent pendant vingt minutes, sans aucun dommage, un bain de  $\text{HgCl}_2$  à 2 p. 100). Malheureusement, à ce moment, la désinfection des larves n'est plus efficace, car elle n'a aucune prise sur les germes ingérés au moment de l'éclosion ou immédiatement après.

Pour saisir le moment le plus favorable à la stérilisation, on prélevait, sur le groupe de 100 œufs examinés (1), un échantillon de 6 à 10 sujets d'essai, que l'on mettait dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau, en les plaçant à la paroi supérieure d'une chambre constituée par une plaque de verre et un petit récipient de verre noir. On dissociait les autres œufs au moyen d'une anse de platine, on les rinçait à plusieurs reprises à l'eau distillée dans un petit verre et on les décantait. Ensuite, on les disposait sur le fond d'une boîte de Petri renversée, en ayant soin de maintenir, à l'intérieur, une atmosphère saturée d'humidité et on les mettait pendant deux heures à la glacière. On arrêtait ainsi leur développement, en laissant des témoins suivre leur évolution normale. Grâce à cette manœuvre, les œufs témoins achevaient leur développement une ou deux heures plus tôt, et, au moment de leur éclosion, on procédait à la stérilisation des œufs destinés à l'élevage. Pour cela, on les prélevait avec précaution de la boîte de Petri, on les faisait glisser, en les rinçant, dans un récipient de 30 cent. cubes ; on les lavait alors à plusieurs reprises à l'eau distillée et on les plaçait dans l'appareil de Hansen. Ensuite, on les faisait glisser dans un entonnoir effilé, stérilisé au préalable à l'autoclave, et dont le fond était recouvert de coton hydrophile. On lavait les œufs déposés au fond de l'entonnoir successivement pendant deux minutes à l' $\text{HgCl}_2$  à 0,5 p. 100, une minute à l'eau stérilisée, deux minutes à l' $\text{HgCl}_2$  à 0,5 p. 100 et

(1) On recueillait les œufs fraîchement pondus sur un morceau de viande fraîche mise pendant une heure à une heure et demie dans une cage où l'on élevait des mouches. Cette cage avait 1 mètre sur 0 m. 60. On nourrissait les mouches avec du sucre et des levures.

deux minutes à l'eau stérilisée. En tout, on employait 200 cent. cubes de solution de  $\text{HgCl}_2$  et autant d'eau. Pour réduire la consommation des liquides, on mettait sur l'extrémité de l'entonnoir un petit tuyau de caoutchouc, dont on fermait la lumière soit par une pince, soit en le serrant avec les doigts. Une fois la stérilisation effectuée, on retirait coton et œufs avec un pince stérile et on les plaçait dans une boîte de Petri sur une couche d'agar-agar (solution de 3 à 4 p. 100 dans de l'eau distillée). Il va de soi que, sur ce milieu, les germes, survivant à la stérilisation et malgré elle, ne se développent que très lentement.

Ensuite, on retirait de l'appareil de Hansen la boîte avec les œufs et on la plaçait sous une cloche de verre. Au bout de trois heures, ou même plus tôt, on procédait au transfert des larves écloses. On les transportait par dizaines à l'aide d'un fil de platine dans de grands tubes à essai, contenant 15 grammes de bouillie de cervelle de veau (Wollman, 1922 ; Hobson, 1932). Pour préparer cette bouillie, on chauffait, dans un petit bocal, de la cervelle hachée pendant une demi-heure à la température de  $100^\circ \text{C.}$ , puis on l'écrasait avec une baguette de verre contre les parois du récipient, de sorte que le liquide libéré lors du chauffage s'incorporait au coagulum. On versait ensuite la bouillie obtenue dans les tubes (15 grammes dans chaque tube de 60 cent. cubes), et l'on stérilisait, à quatre reprises, pendant trente minutes à  $100^\circ$ . Pour préserver les bouchons de coton contre la poussière, on les revêtait de capuchons en papier, serrés par de petits élastiques. Trois jours après le transport sur ce milieu nutritif (de même, du reste, que sur la viande infectée), les larves atteignent à peu près la moitié de leur grandeur définitive et le contenu du tube se liquéfie grâce à l'action protéolytique des enzymes digestifs éliminés par les larves avec les matières fécales. On prélevait avec une anse de platine flambée une goutte de cette masse liquéfiée pour l'ensemencer dans un tube avec du bouillon. Aussitôt après, on infectait le tube contenant les larves avec un nombre considérable de microbes en cultures pures. Trois jours plus tard, lorsque les larves avaient déjà vidé leurs intestins, on ouvrait les tubes, on en retirait les larves avec une longue pince, on les lavait à plusieurs reprises à l'eau stérilisée dans des récipients neufs, on les séchait avec du papier filtre (dans les boîtes de Petri) et on les transportait une à une dans des tubes bien secs, à fond recouvert de coton hydrophile. Dans ces tubes s'effectuait la pupaison des larves. La diffusion des gaz à travers les bouchons de coton satisfaisait pleinement aux besoins respiratoires des larves et nul autre agencement n'était nécessaire.

On soumettait les pupes obtenues aux procédés précédemment décrits tels que : stérilisation, transfert dans les tubes secs, etc. Il va de soi qu'on n'employait que les tubes dont les témoins restaient stériles.

Il y a lieu de noter que les cas d'infection dans les tubes de contrôle étaient très rares : sur 300 larves écloses d'œufs stérilisés, une seule était infectée. Ce fait confirme les résultats de Wollman (1911), selon lesquels l'intérieur des œufs nor-



maux de la mouche à viande ne contient jamais de microbes. Les résultats contraires des autres auteurs (Bogdanoff, 1908) sont dus à une stérilisation défectueuse de l'extérieur des œufs.

### Partie expérimentale.

#### I. — EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES.

Les premières expériences consistaient à submerger dans de la gélose nutritive des mouches vivantes écloses de pupes stérilisées. On plaçait les tubes contenant ces mouches à l'étuve à différentes températures dans des conditions aérobies et anaérobies. Il résulte de ces expériences qu'au moins 80 p. 100 des mouches, provenant de larves infectées, ont l'intestin stérile et ne contiennent probablement pas de microbes dans les tissus de leurs corps.

TABEAU I. — Résultats concernant les mouches vivantes immergées dans de la gélatine (1).

	NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Nombre de mouches immergées dans le milieu à la gélatine..	31	39	44	29	45	45	33	42	45
Nombre de tubes infectés . . .	2	6	3	10	2	4	2	4	0

Dans de nombreux tubes, la gélatine se liquéfiait, mais restait transparente. On ensemait cette gélatine liquéfiée dans de nouveaux tubes contenant soit de la gélatine nutritive, soit des milieux liquides composés d'eau peptonée additionnée de glucose et de saccharose et de filtrat de culture fraîche de levures de boulanger. Tous ces ensemencements donnaient des résultats négatifs. La liquéfaction de la gélatine est pro-

(1) Composition du milieu nutritif : expériences I à VIII : gélatine, 10 p. 100 ; peptone, 0,5 p. 100 ; glucose, 1 p. 100 ; bouillon (à réaction neutre ou faiblement alcaline), 88,5 p. 100 ; expérience IX : gélatine, 10 p. 100 ; moût de bière (à réaction faiblement acide), 90 p. 100.

duite par l'action protéolytique des enzymes de la mouche, qui ne meurt qu'au bout de quelques jours dans la gélatine, même solidifiée. La cause de ce phénomène réside dans le fait qu'il est bien difficile de plonger une mouche dans la gélatine liquide car, étant très légère, elle émerge à la surface, ce qui rend la respiration possible (1).

Les mouches enfermées dans des tubes bien secs ne dissolvaient pas la gélatine, jusqu'à leur mort par inanition.

Si l'on plonge la mouche vivante dans de la gélatine et que l'on refroidisse le tube en le maintenant dans une position oblique, on observe que la gélatine commence à se liquéfier d'abord au voisinage immédiat de l'anus. On peut en conclure que les enzymes protéolytiques sont éliminés surtout avec les matières fécales et non avec la sécrétion des glandes salivaires.

Les expériences sur la submersion des mouches vivantes dans la gélatine n'ont pu nous expliquer pourquoi, dans une expérience seulement, nous avons obtenu 100 p. 100 de mouches stériles, tandis que dans d'autres ce pourcentage oscillait de 70 à 90 p. 100. Il s'agissait de savoir si ces mouches étaient infectées seulement par des microbes isolés provenant des enveloppes chitineuses insuffisamment stérilisées, ou bien si elles contenaient des quantités plus considérables de germes ingérés lorsque l'animal était encore à l'état larvaire.

Nous avons trouvé la solution de ce problème dans les expériences du second type.

Dans ce but, on triturait la mouche dans 1 c. c. 5 à 2 cent cubes d'eau ; on versait la suspension obtenue dans une boîte de Petri et on la mélangeait avec de la gélatine nutritive. En même temps, on commençait une autre boîte, en délayant la suspension, par rapport à la première, environ mille fois.

On triturait et on mélangeait avec de la gélose nutritive la mouche elle-même et les enveloppes (puparia), rejetées par l'insecte au moment

(1) La résistance de la mouche est vraiment étonnante. Elle supporte pendant vingt-quatre heures la submersion dans la gélatine. Placée sous une cloche pneumatique, elle survit, et dès qu'on fait pénétrer l'air sous la cloche elle se ranime et reprend son comportement normal. Ces mêmes exemples d'anaérobiose ont été observés par divers auteurs chez les autres insectes.

de l'éclosion : on ensemait les matières fécales et le méconium larvaire. Afin d'éviter la dessiccation des germes qui pourraient s'y trouver éventuellement, on prenait les excréments encore humides.

Les expériences ainsi conçues déterminaient non seulement le degré d'infection de l'individu examiné, mais permettaient d'établir si les bactéries provenaient d'une infection de l'enveloppe, ou bien si elles étaient localisées dans l'intestin ou dans les tissus de l'insecte. Etant donné que quelques germes isolés, introduits de l'extérieur dans l'intestin, auraient pu s'y multiplier et par conséquent fausser les résultats de l'expérience, on triturait des mouches très jeunes, c'est-à-dire celles qui n'avaient pas encore déployé leurs ailes et changé de couleur (1).

Les résultats de ces expériences sont très intéressants et tout à fait inattendus. On a trouvé que les mouches très jeunes contenaient de grandes quantités de microbes, *et dans certains cas, ces quantités étaient même énormes*. Comme, en même temps, les excréments de ces mouches se montraient stériles et les cultures faites avec leurs enveloppes broyées ne montraient que quelques germes vivants, tout au plus quelques dizaines, il fallait en conclure que les microbes étaient localisés dans les tissus du corps. Cette hypothèse fut confirmée par des expériences directes qui seront décrites par la suite. Chez les mouches plus âgées de quelques heures, le nombre des bactéries était beaucoup plus petit, et vingt-quatre heures après l'éclosion, presque tous les individus examinés se montraient stériles. Des données plus précises, concernant ces expériences, seront présentées dans les chapitres suivants.

## II. — PÉRIODES DE LA PERSISTANCE ET DE LA DISPARITION DES MICROBES AU COURS DE LA MÉTAMORPHOSE.

Pour élucider le problème du mécanisme de la disparition de microbes ingérés au stade larvaire, il fallait déterminer, tout d'abord, la période où avait lieu ce phénomène. Avant

(1) Les mouches fraîchement écloses sont d'un gris clair, leurs ailes sont froissées. Pendant les deux premières heures de leur vie d'imago, elles déploient leurs ailes et changent de couleur.

les expériences mentionnées plus haut (comportant la trituration des mouches fraîchement écloses), on croyait que les microbes disparaissaient de l'intestin larvaire probablement avant la pupaison, lorsque les larves cessaient d'absorber la nourriture et vidaient complètement leur intestin.

Cette conception se basait, avant tout, sur les phénomènes d'immunité intestinale, observés chez la chenille du ver à soie par Pojarkov (1927). Avant Pojarkov, Duncan (1926) a décrit une série d'expériences, dans lesquelles il constate que la pâte, préparée avec les intestins de différents insectes, aurait une action bactéricide sur certaines espèces de microbes. De même, les résultats obtenus par l'utilisation des larves de mouches à viande dans le traitement des plaies infectées (Brumpton, 1933) semblent parler en faveur de l'hypothèse que ce sont justement certaines substances bactéricides, éliminées par les larves vivantes avec les fèces, ou la sécrétion salivaire, qui jouent le rôle décisif dans la désinfection et le traitement de ces lésions. D'après Livingstone et Prince (1932), des filtres stériles des larves de mouches à viande écrasées, introduits dans des boîtes avec des cultures de microbes pyogènes, détruisent ces cultures. Les facteurs provoquant la bactériolyse ne sont pas sensibles à l'action des températures élevées.

On envisageait, comme seconde éventualité, que la destruction des bactéries se produisait au cours de l'histolyse intense et de la phagocytose de l'intestin larvaire pendant les premiers jours de la métamorphose. Aucune de ces hypothèses ne fut confirmée.

Nos expériences ont démontré que *les microbes ne disparaissent pas de l'intestin larvaire pendant la période pré-pupale.*

Pour ces expériences, on prenait des larves juste au moment où elles allaient se transformer en pupes (aspect de barillet, torpeur). On les irritait par des secousses énergiques jusqu'à ce qu'elles s'allongent et se mettent à ramper. Ensuite, on les traitait de la même manière que les larves destinées à l'élevage ultérieur (cf. partie : Méthodes employées), c'est-à-dire qu'on les lavait à l'eau de robinet et à l'eau stérilisée et qu'on les séchait ensuite avec du papier filtre. Mais au lieu de les laisser vivre et se transformer normalement en pupes, on les écrasait, tout comme les mouches adultes, dans des tubes contenant 1 cent. cube d'eau stérilisée. Pour avoir un contrôle de stérilité de



leurs enveloppes extérieures, on frottait la larve encore vivante contre la surface d'une boîte contenant de la gélose nutritive, immédiatement avant la trituration.

*Cette gélose nutritive, frottée avec la surface de la larve, restait généralement stérile ou ne contenait à peine que quelques colonies isolées. En revanche, la boîteensemencée avec de la pâte de larves écrasées était toujours abondamment infectée (quelques centaines de milliers de colonies par larve).*

Les expériences suivantes devaient déterminer le degré d'infection au cours des différents stades du développement pupal.

On plongeait les pupes examinées, pendant deux minutes, dans un récipient rempli d'eau bromée à saturation, on les lavait à l'eau stérilisée, à deux reprises, en changeant les boîtes, et on les tritrait comme les larves.

Ce procédé a cependant un inconvénient assez sérieux : on introduit forcément dans le liquide examiné des microbes qui, dissimulés entre les segments de la pupa, échappent à l'action du brome (l'extérieur des pupes est complètement stérile). Mais la quantité de ces microbes, comparée au nombre contenu dans l'intérieur des pupes, est infime. Ceci fut prouvé par l'examen des enveloppes pupales, rejetées par les mouches écloses de pupes ainsi stérilisées ; l'ensemencement de ces enveloppes broyées ne donnait que quelques dizaines de colonies tout au plus. On examinait les pupes plus âgées d'une manière un peu différente : la stérilisation finie, on les étalait sur du papier filtre, on faisait sauter avec une lame stérile de rasoir de sûreté l'extrémité antérieure de l'enveloppe et on en retirait la nymphe avec une pince stérile.

Il va de soi que les résultats de ces expériences ne sauraient être précis, étant donné que le nombre des microbes observés dépend du degré de broyage de la pupa examinée ; néanmoins, des déterminations parallèles diffèrent rarement plus que du simple au double et indiquent l'ordre de grandeur du phénomène. Le tableau II résume les résultats de ces expériences. On y voit le jour de développement des pupes examinées et le nombre des colonies dans deux boîtes paral-

lèles, dont chacune contenait une gouttelette de pâte de la pupe étudiée. Comme le volume de cette gouttelette (anse standardisée) contenait 1/1.000 de volume du liquide où l'on avait écrasé la pupe entière, ces chiffres n'indiquent également, il va sans dire, qu'approximativement le nombre total de milliers de bactéries par pupe. Cette série de pupes examinées se composait d'individus nourris sur le même morceau de viande et choisis de façon à ce que leur âge ne différât de plus de deux heures.

TABLEAU II. — Teneur en microbes  
aux stades successifs de la métamorphose.

NUMÉRO de la pupe	AGE de la pupe en jours	NOMBRE DE BACTÉRIES DANS UNE PUPE établi dans deux déterminations successives en milliers	
		Première boîte	Deuxième boîte
I. . . . .	1	44	37
II. . . . .		230	330
III. . . . .		410	280
IV. . . . .		180	210
V. . . . .		40	20
I. . . . .	3	600	500
II. . . . .		130	280
III. . . . .		400	420
IV. . . . .		650	800
V. . . . .		80	110
I. . . . .	11	Plus de 2.000	Plus de 2.000
II. . . . .		500	300
III. . . . .		15	41
IV. . . . .		Environ 2.000	Environ 2.000
V. . . . .		Environ 2.000	Environ 2.000
	13	Eclosion des mouches.	

D'après les données de ce tableau, nous voyons que les microbes ne périssent pas pendant les premiers jours du développement, c'est-à-dire à l'époque où se produisent les processus les plus intenses d'histolyse et de phagocytose. A en juger par ces données, les microbes semblent même se multiplier au cours du développement pupal. Cette multipli-

cation, si toutefois elle a lieu, est cependant fortement limitée. Des nombres, dépassant de beaucoup les données de ce tableau, n'étaient observés que chez des pupes contenant des nymphes mortes ou à moitié décomposées. L'organisme de l'insecte vivant normal dispose apparemment de certains agents, inhibant la multiplication des bactéries et empêchant l'augmentation excessive de leur nombre. Le même phénomène se produit chez les différents insectes par rapport à leurs symbiotes en cas de symbiose intracellulaire (Schwartz, 1932).

*La destruction énergétique des microbes n'a lieu seulement que les derniers jours ou plutôt pendant les deux derniers jours du développement nymphal et pendant les premières heures de la vie de l'imago.* De toute une série d'expériences portant sur cette question, nous allons citer l'expérience III. On y fait la comparaison des nombres de microbes contenus dans les mouches : 1° au moment de l'éclosion ; 2° quatre à sept heures plus tard ; et, 3° après deux jours et ultérieurement.

Cette expérience fut effectuée de la façon suivante :

On transportait 200 pupes stérilisées dans des tubes stériles qu'on plaçait sur des supports, afin de pouvoir observer plus aisément les insectes au moment de leur éclosion. Le jour où avait lieu l'éclosion, on surveillait sans cesse les tubes. Au moment où la mouche commençait à se dégager du puparium, on la sortait du tube et on la mettait sur une feuille de papier filtre. Ensuite, on débarrassait la mouche de son enveloppe au moyen d'une pince stérile et on la broyait dans un peu d'eau stérilisée. On versait cette pâte dans une boîte de Petri et on la mélangeait avec de la gélose nutritive. (On a opéré ainsi avec 25 mouches). On broyait de la même façon 26 autres mouches âgées de quatre à sept heures (pigment bleu-foncé, ailes longues), et, pour finir, on traitait de la sorte 53 mouches âgées de deux à sept jours. On laissait une partie de ces mouches sans nourriture, dans des tubes où eut lieu l'éclosion, une autre partie était transportée dans des tubes avec de la gélose nutritive additionnée de 5 p. 100 d'amidon soluble.

L'infection de l'intestin ou de la surface extérieure du corps de la mouche, même par une seule bactérie, aurait donné une culture abondante sur la surface de la gélose et aurait nécessairement provoqué une forte réinfection de l'intestin de l'insecte. Les résultats de ces expériences sont montrés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Age de la mouche et degré de l'infection.

AGE DE LA MOUCHE	NOMBRE de mouches examinées	NOMBRE DE MOUCHES CONTENANT				
		0 à 1 germe	2 à 10 germes	11 à 100 germes	101 à 1.000 germes	Au-dessus de 1.000 germes
Nymphes à l'avant-dernier jour du développement . . . . .	10	0	0	0	0	10
1 à 30 minutes . . . . .	26	4	2	2	1	17
4 à 7 heures . . . . .	25	5	10	8	1	1
24 heures et davantage . . . . .	53	43	0	0	2	8

D'après les données de ce tableau, nous voyons que le point culminant de l'auto-stérilisation survient pendant les premières heures qui suivent l'éclosion. Sur 10 nymphes à l'avant-dernier jour de développement, il n'y en a pas une seule qui renferme moins de 1.000 microbes; sur les 26 nymphes fraîchement écloses, il y en a déjà 4 stériles, 2 contenant moins de 10 germes et 2 moins de 100 germes; les 17 autres renferment plus de 1.000 germes chacune. Quelques heures plus tard, sur 25 mouches de la même série, il n'y en a qu'une contenant plus de 1.000 germes, 5 stériles, et 10 renfermant moins de 10 germes chacune. Après vingt-quatre heures et plus, sur 53 mouches, il y a 43 individus stériles, 2 contenant plus de 100 et moins de 1.000 germes; les 8 autres ont leur intestin abondamment infecté. Comme ces dernières se nourrissaient sur de la gélose contaminée, nous pouvons supposer que leur infection fut provoquée par des microbes isolés qui s'étaient développés sur cette dernière.

Dans certaines expériences, l'auto-stérilisation de la plupart des pupes avait lieu un peu plus tôt, et notamment pendant les dernières heures de la vie nymphale.



### III. — PASSAGE DES BACTÉRIES DE L'INTESTIN LARVAIRE DANS LES TISSUS DE LA NYMPHE.

Les expériences de Wollman (1914), confirmées dans ce travail, établissent que les œufs de mouche à viande ne renferment pas de microbes dans leur contenu. Des larves fraîchement écloses sont aseptiques et ne se contaminent qu'ultérieurement, après avoir englobé les bactéries infectant leurs enveloppes et la nourriture ingérée. Cette infection se limite probablement à l'intestin de la larve, tandis que les tissus et les liquides de son corps restent stériles. Nous n'en avons malheureusement pas de preuves directes, mais cette supposition semble plausible vu les analogies avec les rapports existant chez les autres animaux. Normalement, les microbes ne peuvent pénétrer à travers les parois de l'intestin qui ne laisse passer que des substances dissoutes ou, tout au plus, des émulsions très fines.

Au cours du remaniement de l'intestin, ayant lieu pendant les premiers jours de la métamorphose, les parois de l'intestin perdent leur étanchéité, et se fragmentent, du moins dans les portions antérieure et postérieure (Perez, 1910) et leurs débris se dispersent peu à peu dans la cavité générale (phagocytose). Ici se pose la question que nous avons déjà formulée au début de ce mémoire : celle de savoir *si, à la suite de ces processus complexes, les microbes passent de l'intestin aux tissus de la future imago*. Cette supposition fut sérieusement confirmée par des expériences, où l'on a constaté que les déjections (meconium larvaire) éliminées par des mouches fraîchement écloses étaient toujours stériles, bien que les mêmes mouches broyées, se montrent abondamment infectées. Ainsi, par exemple, dans une expérience sur 34 mouches, il s'en trouve une contenant (après broyage) plus de 1.000.000 de germes, alors que ses excréments étaient stériles. Dans une autres expérience, sur 50 mouches âgées de quelques heures, et broyées, il y en avait 6 fortement infectées, dont 2 contenant chacune quelques centaines de milliers de germes (non

liquéfiants); les fèces de ces mouches étaient aussi complètement stériles.

Comme dans tous les cas décrits, on broyait des mouches très jeunes, les déjections examinées n'étaient autre chose que du meconium pupal, déposé au-dessous des tubes de Malpighi. On pouvait supposer que les propriétés de ce méconium limitaient le développement des microbes aux portions antérieure et moyenne de l'intestin. Il s'agissait de savoir, en particulier, si les bactéries ne se localisaient pas dans le jabot qui forme une espèce de cul-de-sac très éloigné de l'anus. D'autre part, nous savons (Perez, 1910) que les débris du revêtement épithélial de la portion moyenne de l'intestin larvaire sont éliminés avec le méconium (corps jaune). Les bactéries contenues dans l'intestin larvaire auraient passé avant tout dans ce corps jaune. La solution de ce problème exigeait encore d'autres expériences plus directes. La comparaison du nombre des bactéries contenues dans l'intestin prélevé de la mouche fraîchement éclosée ou de la nymphe mûre, avec celui des bactéries dans le reste des tissus, donnerait à ce point de vue des résultats meilleurs. Malheureusement, il est bien difficile de préparer l'intestin de la mouche dans toute sa longueur et de le débarrasser des tissus adhérents; les tissus et les parois de l'intestin de la mouche fraîchement éclosée, et à plus forte raison ceux de la nymphe, sont, en effet, extrêmement fragiles et se déchirent facilement. Seule, la portion de l'intestin correspondant au thorax (avec le jabot, arrivant à la partie supérieure de l'abdomen) présente une résistance assez considérable. C'est pourquoi les expériences projetées furent effectuées de la façon suivante :

Un jour avant l'éclosion, on stérilisait les pupes à l'eau bromée, on les séchait sur une feuille de papier filtre, on sortait les nymphes de leurs enveloppes et on les étendait sur leur face ventrale. Ensuite on tirait avec précaution la tête de la nymphe avec une pince, en retenant le thorax à l'aide d'une lame de rasoir. Procédant de la sorte, on extrait non seulement la tête, mais aussi l'oesophage avec le jabot. En enlevant d'un côté la tête, de l'autre l'abdomen, on parvenait à obtenir les deux éléments voulus : le tube des tissus du thorax, vidé de l'intestin, et la portion correspondante (même un peu plus longue) de l'intestin. On broyait séparément chacun de ces éléments et on les ensemait sur de la gélose nutritive. On écrasait avec une pince les

tissus du thorax dans un tube contenant 1 cent. cube à 1 c. c. 5 d'eau et l'on triturerait, à l'aide d'une baguette en verre, la portion correspondante de l'intestin dans 1 goutte d'eau dans la boîte de Petri même. Pour éviter la dessiccation de l'intestin, on le transportait dans la goutte immédiatement après son extraction du corps de la nymphe.

TABLEAU IV. — Teneur en bactéries  
des différentes parties du corps de la nymphe.

NUMERO de la nymphe	TÊTE	PARTIE thoracique du tube digestif (jabot compris)	THORAX débarrassé du tube digestif	ABDOMEN	LYMPHE suintant de la plaie après la section de la tête
1. . . . .	5	3	Environ 2.000		0
2. . . . .	0	0	12		0
3. . . . .	0	4	70		0
4. . . . .	1	10	80		0
5. . . . .		0	75		0
6. . . . .	0	3	80		0
7. . . . .	0	4	350		0
8. . . . .		1	300		0
9. . . . .		6	250		0
10. . . . .		6	400		0
11. . . . .		5	90		
12. . . . .		6	Environ 2.000		0
13. . . . .	15	3	Environ 3.000	Environ 50.000	0
14. . . . .	4	1	150	Environ 1.000.000	0
15. . . . .	9	4	200		0

Les résultats de ces expériences étaient nets et significatifs. Les boîtes contenant l'intestin ne donnaient que quelques colonies (tout au plus quelques dizaines); il y en avait quelques-unes qui se montraient stériles. En revanche, la portion correspondante du thorax contenait quelques centaines de colonies et, dans certains cas, quelques milliers. Dans la tête, prise à part, on ne trouvait que bien peu de bactéries, alors même que le thorax était infecté par des quantités énormes de microbes. De ce que nous venons de dire, on peut tirer une conclusion importante : les bactéries ne circulent pas librement dans l'hémolymph, mais sont soit absorbées, soit renfermées d'une certaine manière dans les tissus du corps. Si les bactéries se trouvaient dans l'hémolymph, le rapport de la quantité de bactéries, contenues dans la tête, à celle de microbes contenus dans le thorax devrait correspondre aux rapports des volumes ou plutôt des poids de ces parties du

corps. Ceci est d'autant plus évident que les microbes isolés du contenu de la pupa se montraient, pour la plus grande partie, extrêmement agiles et très petits. Etant donné que les vaisseaux sanguins sont assez larges, il est peu probable que l'infection du sang soit limitée au thorax et à l'abdomen sans affecter la tête. Le fait que *la lymphe s'écoulant du thorax après la section de la tête se montrait toujours stérile, alors même que le degré d'infection du thorax était très important* peut être considéré comme une preuve définitive.

Les résultats sur la localisation de bactéries dans le corps de la nymphe sont rassemblés dans le tableau IV.

Il y a lieu de rappeler, ainsi qu'il résulte des chapitres précédents, que les bactéries, localisées dans les tissus adhérent à l'intestin de la nymphe, disparaissent pendant le dernier jour du développement pupal et les premières heures de la vie de l'imago.

#### IV. — RECHERCHES QUALITATIVES.

Les recherches que nous venons de décrire étaient purement quantitatives. Ces expériences ne portaient ni sur la composition spécifique des microbes constituant la flore normale de l'intestin des larves et des pupes, ni sur le problème du comportement des espèces étrangères, normalement absentes de l'intestin de la larve.

Afin d'élucider ces questions, nous avons entrepris une série d'expériences dans les buts suivants : 1° Isoler les souches qu'on trouve habituellement dans le contenu de pupes âgées d'un jour ; 2° Etudier par la méthode des cultures pures, lesquelles de ces souches persistent jusqu'à la fin du développement pupal, pour passer ensuite de l'intestin aux tissus ; 3° Comment se comportent, en cultures pures, des microbes étrangers tels que *Bact. prodigiosum*, *Bact. pyocyaneum*, *Bac. coli*, *Bac. subtilis* ; 4° Trancher la question : La prédominance de certaines espèces dans la flore intestinale est-elle due à l'action sélective de la larve même ou bien n'est-elle que le résultat des activités antagonistes d'autres espèces microbiennes ?



TABLEAU V. — Propriétés des bactéries de la flore intestinale des larves adultes.

	SOUCHES					
	A	B	C	D	E	F
Température optima .	Env. 37°C	Env. 37°C	Env. 30°C	Env. 37°C	30°C à 37°C	Env. 37°C
Mouvement. . . . .	+	+	—	+	—	—
Dimensions. . . . .	0,7 $\mu$ $\times$ 0,3 $\mu$	0,7 $\mu$ $\times$ 0,3 $\mu$	0,5 $\mu$ cocci.	0,7 $\mu$ $\times$ 0,3 $\mu$	0,7 $\mu$ $\times$ 0,3 $\mu$	2,0 $\mu$ $\times$ 0,5 $\mu$
Liquéfaction de la gélatine . . . . .	—	—	—	—	+	+
Couleur des colonies sur la pomme de terre.	Jaune.	Blanche.	Jaune.	Blanche.	Jaune-pâle.	Blanche.
Dextrine . . . . .	—	—	—	—	—	A.
Glucose. . . . .	A. G. (1)	A. (2)	—	—	—	A.
Levulose . . . . .	A. G.	A.	—	—	—	A.
Galactose. . . . .	A. G.	A.	—	—	—	—
Saccharose. . . . .	—	—	—	—	—	A.
Lactose. . . . .	—	—	—	—	—	—
Maltose. . . . .	—	—	—	—	—	A.
Glycérine . . . . .	—	—	—	—	—	—
Mannite . . . . .	—	A.	—	—	—	—
Dulcite. . . . .	—	—	—	—	—	—
Sorbite. . . . .	—	—	—	—	—	—
Salicine . . . . .	—	A.	—	—	—	—
Réduction des nitrates.	+	+	—	—	—	+
H <sub>2</sub> S. . . . .	—	—	—	—	—	—
Gram. . . . .	—	—	—	—	—	—
Indol. . . . .	+	+	—	—	—	—

(1) A. G. = acide et gaz.  
(2) A. = acide.

On a isolé 6 espèces de microbes du broyage des pupes âgées d'un jour. Les propriétés biochimiques de ces espèces sont présentées dans le tableau V. La plupart de ces espèces ne liquéfient pas la gélatine ; elles sont indiquées dans ce tableau comme souches A et B.

Cette flore « normale » n'est pas très fixe. Non seulement chez les différents individus prédominaient soit les unes, soit les autres des espèces citées dans le tableau, mais il en apparaissait parfois encore d'autres. Si des larves normales étaient enlevées de la viande infectée sur laquelle on les nourrissait et si on les mettait, après les avoir légèrement affamées, sur du hachis de viande fraîche, additionné de bouillon, contenant une jeune culture de *Bact. pyocyaneum* ou *Bact. prodigiosum*, on pouvait retrouver ces espèces aussi bien chez les

pupes très jeunes que chez des nymphes déjà avancées dans leur développement.

On n'a pu retrouver, dans les mêmes conditions, ni *Bact. coli*, ni une certaine espèce sporulée liquéfiant la gélatine

L'élevage des larves contaminées avec des cultures pures de bactéries citées dans le tableau V, a montré que toutes ces bactéries persistaient dans les tissus de nymphes jusqu'à l'avant-dernier jour du développement larvaire. C'est au dernier jour de la métamorphose ou pendant les premières heures de la vie d'imago que survient leur destruction définitive.

Contrairement aux prévisions de l'auteur, on a trouvé que même les espèces étrangères n'appartenant pas normalement à la flore de pupes, se comportaient en principe de la même manière. Le nombre des bactéries persistant dans le corps de la nymphe jusqu'à la fin de la métamorphose était généralement considérable. Le tableau VI présente les résultats des déterminations du nombre des bactéries trouvées dans les pupes et les mouches élevées de larves infectées avec une culture pure de *Bact. coli*. Les expériences avec les larves contaminées avec les cultures d'autres microbes (*Bact. pyocyaneum*, *Bact. prodigiosum*, *Bac. subtilis*) donnaient des résultats analogues.

TABLEAU VI. — Nombre de bactéries contenues dans les pupes infectées de colibacilles en culture pure.

AGE DES PUPES en jours	NOMBRE DE GERMES CONTENUS DANS LES PUPES en milliers		
	1 <sup>re</sup> pupa	2 <sup>e</sup> pupa	3 <sup>e</sup> pupa
1 . . . . .	800	400	7
5 . . . . .	500	400	120
9 . . . . .	400	350	300
10 . . . . .	0,000	0,020	0,012
Mouches âgées de 1 jour.			

De ces quatre espèces, *Bac. subtilis* persistait dans le corps des nymphes en quantités les plus faibles.

Par contre, le *Bact. pyocyaneum* s'est montré le plus tenace, et l'organisme de l'insecte avait bien du mal à combattre l'infection déterminée par la culture pure de ce microbe. Sur

13 pupes contaminées avec *Bact. pyocyaneum*, 2 étaient complètement décomposées et contenaient des quantités énormes de microbes vivants.

Les résultats des expériences avec le broyage des mouches (âgées de vingt-quatre heures) provenant de larves contaminées avec des cultures pures de différents microbes sont présentés dans le tableau VII (4).

Les cultures pures de microbes étrangers à la flore banale du contenu larvaire sont donc tolérées aussi bien par l'intes-

TABLEAU VII. — Nombre de germes contenus dans des mouches broyées âgées de un jour et provenant de larves infectées avec des cultures pures de différentes bactéries.

ESPÈCE microbienne	NOMBRE de mouches étudiées	NOMBRE DE MOUCHES CONTENANT		
		de 0 à 1 germe	de 2 à 50 germes	au-dessus de 100 germes
A . . . . .	6	5		1
B . . . . .	7	6	1	
C . . . . .	8	8		
D . . . . .	3	3		
E . . . . .	3	3		
F . . . . .	2	2		
<i>Bact. coli</i> . . . . .	3	2	1	
<i>Bact. prod.</i> . . . .	1	1		
<i>Bact. pyoc.</i> . . . .	3	1	1	1
<i>Bac. subtilis</i> . . .	18	15	1	2

tir. de la larve adulte (jusqu'à l'avant-dernier jour de la métamorphose) que par les tissus de la nymphe en formation. Il s'ensuit que la prédominance de certaines espèces dans la flore des pupes est, dans une large mesure, le résultat de l'action antagoniste des différentes bactéries, et non celui de l'action bactéricide sélective de l'organisme même de l'insecte.

Aussi, il faudrait traiter avec une certaine réserve l'interprétation des résultats positifs obtenus dans le traitement des

(1) Dans l'une de ces expériences préliminaires, on broyait les mouches écloses de larves nourries avec du hachis de viande additionné de terre de jardin (bactéries sporulées). On a examiné 37 de ces mouches ; l'une d'elles contenait 50 microbes, une autre 12 ; le reste (au nombre de 35) était aseptique.

plaies par l'utilisation de larves aseptiques de mouches à viande. Selon nous, ils ne sauraient être attribués à l'action bactéricide de ces larves. Il en est de même des résultats de Livingstone et Prince (1932) selon lesquels des filtrats, du produit de broyage des larves, détruisent les microbes pyogènes. Cette prudence est d'autant plus justifiée que selon les expériences plus anciennes de Tebbut (1912), des filtrats de pâte des larves ne produisent aucun effet nocif même sur un organisme aussi sensible que le *Bact. dysenteriae*.

Nous ne voudrions nullement contester la valeur pratique



FIG. 1. — Tube digestif de la mouche (d'après Graham-Smith).  
Les hachures marquent la partie du tube sortant avec la tête, lors de l'extraction

de cette application médicale, il se peut que les larves agissent d'une manière immédiate sur la plaie.

### Interprétation des résultats.

L'hypothèse phagocytaire est, de nos jours, la seule qui rende possible l'enchaînement et l'interprétation des faits constatés. A la lumière de cette hypothèse, les phénomènes déterminant le sort des microbes pendant les stades successifs de la métamorphose, se présenteraient comme il suit : pendant l'histolyse (1) de l'intestin, les bactéries adhérant aux parois

(1) Selon Perez (1910), les portions antérieure et postérieure sont les seules qui subissent l'histolyse phagocytaire. La portion moyenne n'est pas phagocytée, mais des phénomènes analogues à la phagocytose surviennent dans sa lumière qui concernent le manteau épithélial larvaire (qui forme « le corps jaune »). Ce corps jaune est éliminé avec le méconium larvaire après l'éclosion de la mouche adulte.



de l'intestin sont absorbées par les phagocytes et dispersées avec eux dans la cavité générale. Après un certain temps, les phagocytes chargés de fragments des tissus absorbés atteignent des dimensions énormes et se localisent dans les tissus, ne pouvant plus, à cause de leur grandeur, se déplacer dans l'hémolymphe. Aussi, les bactéries enfermées à leur intérieur disparaissent-elles des liquides du corps pour réapparaître dans les tissus entourant l'intestin en voie de remaniement. Il se peut, d'ailleurs, que ce phénomène se passe un peu autrement ; par exemple, qu'au début, les bactéries pénètrent sans entraves dans l'hémolymphe, mais qu'après quelque temps elles y soient englobées par des phagocytes, qui, à leur tour, s'entourent de cellules, formant autour d'eux une espèce de capsule.

Metchnikov et ses élèves ont observé, à plusieurs reprises, la formation de ces capsules après l'introduction sous la peau des chenilles de *Galleria mellonella* de grandes quantités de différents microbes, surtout de bacilles tuberculeux (Biron, 1934). De cette manière, les chenilles de *Galleria mellonella* peuvent neutraliser de grandes doses de bactéries, pesant environ 2 milligrammes. D'autres corps étrangers, tels que, par exemple, les grains de carmin, introduits sous la peau de la chenille, sont phagocytés également et localisés dans des capsules (Metchnikov, 1924; Iwasaki, 1925).

Les bactéries, emprisonnées à l'intérieur des phagocytes et des capsules ne périssent pas toujours immédiatement après l'absorption. Ainsi, par exemple, des bacilles de la lèpre et de la tuberculose, introduits dans la cavité générale du phasme *Dixippus morosus* subsistent pendant quelques jours à l'intérieur des phagocytes et des cellules géantes. Des bacilles de la lèpre introduits dans le corps de *Galleria mellonella* se comportent de la même façon (Metchnikow et Toumanoff, 1923 ; Toumanoff, 1923). C'est un curieux exemple de symbiose « synthétique », si importante pour l'interprétation de nos résultats.

Les bactéries absorbées par les phagocytes pendant la métamorphose de la mouche à viande se conduisent probablement de la même manière. C'est seulement au dernier jour du déve-

loppement nymphal que leur destruction définitive a lieu. Elle est provoquée par un métabolisme plus actif ou par quelques processus biochimiques intervenant dans les tissus ou dans les phagocytes eux-mêmes. Etant donné que la destruction phagocytaire bat son plein, justement au cours des premières heures de la vie d'imago caractérisées par des processus d'oxydation très intenses (changement de pigment de l'enveloppe chitineuse), nous pouvons admettre que cette activité des phagocytes est déterminée par quelques réactions d'oxydation. A l'appui de cette hypothèse, nous pouvons citer le travail de Hollande (1920) qui affirme que la phagocytose est accompagnée de certaines réactions d'oxydation, ayant pour résultat la production d'un pigment foncé.

Il va de soi que nous ne saurions attribuer ce caractère d'oxydation aux phénomènes de destruction des bactéries qu'à titre d'hypothèse, celle-ci nécessitant des études plus détaillées. Nous avons constaté que, dans la pâte obtenue par broyage d'une mouche dans 1 cent. cube d'eau distillée (quelques minutes après son éclosion) le processus de destruction ne se produit pas.

L'hypothèse phagocytaire nous permet seulement d'expliquer les phénomènes survenus dans les tissus de l'insecte. Il nous reste à élucider les processus déterminant la disparition des microbes dans l'intestin et surtout dans sa portion moyenne où, selon Perez, les phagocytes ne pénètrent jamais. Il se peut que, dans ce cas, ils soient remplacés par les cellules propres de l'intestin. Ces cellules entourent et s'insinuent dans l'épithélium larvaire rejeté dans la lumière de l'intestin (formation du « corps jaune », Perez [1910]). D'autre part, nous pouvons admettre l'existence, dans l'intestin moyen, de certains facteurs bactéricides spécifiques, dont l'activité ne se révèle qu'au cours de la métamorphose. Il y a lieu de signaler que la réaction de cette portion de l'intestin est fortement acide (Hobson, 1931-1932).

Cette question, pour être définitivement élucidée exige des observations microscopiques directes par des méthodes histologiques. Nous croyons qu'il serait opportun d'utiliser dans ces expériences, à la place des larves normales, des larves

aseptiques, contaminées avec des cultures pures de microbes de grandes dimensions, tels que : *Bact. pyocyaneum* ou *Bact. prodigiosum*.

Revenant aux phénomènes survenant dans les tissus, nous pouvons constater que les rapports entre les bactéries et l'organisme de l'insecte constituent, au cours du développement nymphal, une espèce de symbiose intracellulaire non spécifique, couronnée par la destruction des bactéries au moment du passage de l'organisme au stade d'insecte adulte. Ceci peut servir d'appui à l'hypothèse que l'apparition de la symbiose intracellulaire permanente possède également, en principe, le caractère d'une réaction défensive de l'organisme contre l'infection (Schwartz, 1935).

Nous ne croyons pas que les phénomènes caractéristiques de la métamorphose de la mouche à viande se passent de façon identique chez les autres insectes. Selon Pojarkoff (1927), chez le ver à soie, par exemple, prédominent les phénomènes d'immunité intestinale. Chez *Tenebrio molitor*, les bactéries de l'intestin larvaire sont éliminées mécaniquement dans le revêtement épithélial lors de la dernière mue (Butsch, 1926).

Nous ne jugeons pas nécessaire de nous arrêter ici aux phénomènes de transport des germes pathogènes par certains insectes (mouche tsé-tsé, pou, moustique), car ces phénomènes sont plutôt des infections caractéristiques de ces insectes.

### Résumé.

1° Les œufs normaux de *Calliphora erythrocephala* ne contiennent pas de bactéries. Après une stérilisation appropriée de leur extérieur, on peut obtenir plus de 99 p. 100 de larves aseptiques. Les larves ne se contaminent qu'après l'éclosion ;

2° Les larves, à la veille de pupaison, ainsi que les pupes âgées de quelques heures (et plus) contiennent des quantités énormes de microbes (jusqu'à 2.000.000 par individu). Cette flore normale est composée surtout de 6 espèces de microbes apparaissant en différentes proportions chez les différents individus. Les espèces indiquées, dans le tableau V, comme souches A et B prédominent ;

3° *Bact. pyocyaneum* et *Bact. prodigiosum*, englobés par des larves avec la dernière portion de la nourriture passent à l'intérieur des pupes. Dans les conditions analogues *Bact. coli* n'a pas été retrouvé. Il en résulte que la composition de la flore normale n'est pas bien définie : elle dépend, dans une certaine mesure, de la composition bactérienne de la nourriture des larves ;

Lors de la contamination des élevages aseptiques des larves par différentes espèces de la flore intestinale de ces mêmes larves adultes, toutes les bactéries examinées passaient à l'intérieur de la pupa. La constitution de la flore normale est le résultat du jeu des antagonismes des différentes espèces de bactéries et non celui d'une action bactéricide de l'intestin lui-même. Cependant on ne saurait exclure la possibilité de l'action inhibitrice de l'intestin sur certaines espèces de microbes.

5° *Au cours de la métamorphose, les bactéries disparaissent de l'intestin larvaire et passent dans les tissus de la nymphe. Elles se localisent dans les tissus de telle manière qu'elles ne peuvent pénétrer ni dans l'hémolymph, ni dans les tissus de l'insecte adulte ;*

6° Jusqu'à l'avant-dernier jour du développement pupal, la quantité des bactéries ne subit pas de changements notables. La multiplication rapide des bactéries n'a lieu que chez les individus morts ;

7° *Au dernier jour du développement nymphal a lieu la destruction violente des microbes localisés dans les tissus de la nymphe. Ce processus est très intense et finit généralement quelques heures après l'éclosion de la mouche adulte. Dans un nombre très restreint de cas, les bactéries persistent même deux jours après l'éclosion (quelques dizaines par individu). La plupart ne contiennent pas une seule bactérie vivante, ni dans les tissus, ni dans l'intestin après une durée de quelques heures ;*

8° Les microbes étrangers en cultures pures, englobés par des larves aseptiques, se comportent, en principe, de la même façon que les bactéries appartenant à la flore normale des pupes. Ceci est également vrai pour les espèces asporulées



(*Bact. coli*, *Bact. prodigiosum*, *Bact. pyocyaneum*) et sporulées (*Bac. subtilis*);

9° Nous pouvons admettre à la base de ces faits que le mécanisme d'immunité, fonctionnant au cours du développement de la mouche à viande a, avant tout, un caractère cellulaire. Cette hypothèse peut nous expliquer aussi bien les phénomènes de passage des bactéries de l'intestin larvaire aux tissus, que leur localisation dans les tissus (et non pas dans la lymphe) aux stades ultérieurs du développement.

A la lumière de cette hypothèse, les rapports entre l'organisme de la mouche et les bactéries constitueraient une espèce de symbiose intracellulaire temporaire et non spécifique. Ceci peut servir d'appui à l'hypothèse que l'apparition de la symbiose intracellulaire typique permanente a, en principe, le caractère d'une réaction de défense de l'organisme contre l'infection.

Je tiens à remercier M. le prof. K. Bassalik, directeur de l'Institut de Physiologie végétale, des précieux conseils qu'il a bien voulu me prodiguer.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BACOT (A.-W.). *Parasitology*, **4**, 1911, p. 68-74.  
 BACOT (A.-W.). *Journ. Hyg.*, Plaque, 1912, Suppl. 1.  
 BOGDANOW (E.-A.). *Arch. f. ges. Physiol.*, **113**, 1906, p. 97-105.  
 BOGDANOW (E.-A.). 1908, *Supplementband*, p. 173-199.  
 BIRON (M.). *Ces Annales*, **53**, 1934, p. 404-417.  
 BRUMPT (E.). *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, **11**, p. 403-417.  
 BUCHNER (P.). *Tier und Pflanze in Symbiose*, 1930, p. 1-900.  
 BUTSCH (W.). *Tierärztliche Rundschau*, **4**, 1926, p. 57.  
 CAO. *Ann. Ig. sper.*, **16**, 1906, p. 645\*.  
 DANIELS. *Federated Malay States*, **3**, 1903, p. 56\*.  
 DUNCAN (T.-J.). *Parasitology*, **18**, 1926, p. 238-252.  
 FAICHNIE (N.). *Journ. Royal Army Med. Corps*, **13**, 1909, p. 580\*.  
 GALLI-VALERIO (B.). *Zentr. f. Bakt., Orig.*, **54**, 1910, p. 193.  
 GLASER (R.-W.). *Amer. Journ. Hyg.*, **3**, 1923, p. 469-480.  
 GRAHAM-SMITH. *Cambridge University Press*, 1914, p. 1-389.  
 HEVITT-GORDON (C.). *Cambridge University Presse*, 1914, p. 1-382.  
 HENNIGER (E.). *Zentr. f. Bakt.*, Ref. 88, 1928, p. 433-461.  
 HOLLANDE (A.-Ch.). *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1920, p. 726.  
 HOLLANDE (A.-Ch.). *Arch. Zool. Exp.*, **70**, 1930, p. 231-280.  
 HOBSON (R.-P.). *Journ. Exp. Biol.*, **8**, 1931, p. 109-123.  
 HOBSON (R.-P.). *Journ. Exp. Biol.*, **9**, 1932, p. 123-138.



- IWASAKI (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 95-98.
- KRONTOWSKI (A.). *Zentr. f. Bakt., Orig.*, **68**, 9113, p. 586.
- LEACH (J.-G.). *Phytopathology*, **16**, 1926, p. 149-175.
- LEACH (J.-G.). *Zeits. angew. Ent.*, **20**, 1933, p. 150-161.
- LEDINGHAM (J.-C.-G.). *Journ. of Hyg.*, **11**, 1911, p. 333-340.
- LIVINGSTON (S.-K.) et PRINCE (L.-H.). *Journ. Amer. Med. Ass.*, **98**, 1932, p. 1143-1149.
- METALNIKOV (S.) et TOUMANOFF (K.). *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 1923, p. 935-936.
- METALNIKOV (S.). *Ces Annales*, **38**, 1924, p. 787-826.
- METALNIKOV (S.). L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles (*Galleria mellonella*). *Monographie de l'Inst. Pasteur*, Masson, édit., 1927.
- MUZZARELLI (E.). *Ann. d'Ig.*, **35**, 1925, p. 219-228.
- NICHOLLS (L.). *Bull. Ent. Res.*, **8**, 1912, p. 81-8.
- PAILLOT (CH.). *Infection chez les insectes. Immunité et symbiose*. Imp. de Trévoux, G. Patissier, 1933, p. 1-535.
- PEREZ (CH.). *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **4**, 1910, p. 1-274.
- PETRAGNANI (G.). *Sperimental Ig.*, **79**, 1925, p. 493-502\*.
- POJARKOW (E.). *Russ. Fizjolog. Journ. im. Secz.*, **10**, 1927, p. 157-162.
- RUSSO (C.). *Bull. Office inter. Hyg. publ.*, **22**, 1931, p. 2108-2120.
- SCHUCKMANN (W.). *Zentr. f. Bak.*, Ref. 81, 1926, p. 481-505, 529-568.
- SCHWARTZ (W.). *Arch. f. Mikrobiol.*, **3**, 1932, p. 453-472.
- SCHWARTZ (W.). *Arch. f. Mikrobiol.*, **6**, 1935, p. 369-460.
- TEBBUT (H.). *Jl. Hyg.*, **12**, 1932, p. 516-526.
- TOUMANOFF (K.). *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 1925, p. 14-17.
- WOLLMANN (E.). *Ces Annales*, **25**, 1911, p. 79-88.
- WOLLMANN (E.). *Ces Annales*, **35**, 1912, p. 431-449.
- WOLLMANN (E.). *Ces Annales*, **36**, 1922.

(Les Mémoires marqués d'un astérisque ne sont connus que d'après les citations.)

## LE ROLE DU SYSTÈME NERVEUX DANS L'IMMUNITÉ

par V. ZERNOFF.

Dans l'immunité, de nombreuses réactions sont souvent considérées comme autonomes dans l'organisme. Suivant cette conception, ces réactions sont provoquées dans différentes cellules et tissus sans être dirigées ou ordonnées par le système nerveux ; ces réactions biologiques très complexes ont été comparées aux réactions chimiques et physiques que l'on obtient dans un tube à essai.

Mais cette manière de voir ne peut pas expliquer les nombreux phénomènes de défense qui se passent dans l'organisme. Il faut plus vraisemblablement envisager l'immunité comme provoquée par un ensemble de réactions liées solidairement les unes aux autres et qu'il serait difficile de se représenter indépendantes de l'organisme au sein duquel elles se produisent et qui doivent être influencées par le système nerveux.

En abordant cette question complexe, nous voulons souligner la divergence que l'on remarque entre le point de vue des expérimentateurs de laboratoire et celui des cliniciens en ce qui concerne le rôle joué par le système nerveux central dans l'évolution de différentes maladies.

Dans le domaine de la médecine pratique, on attribue une grande importance à l'état du système nerveux et au moral du malade, les cliniciens ayant fréquemment observé l'influence qu'ils peuvent avoir sur l'évolution des maladies les plus diverses. Conserver un bon moral à son patient devient souvent la principale préoccupation du médecin qui, en agissant sur l'état psychique de son malade, pense augmenter ainsi la résistance de son organisme et, par suite, agir favorablement sur l'évolution de la maladie.

Dans la médecine expérimentale, par contre, l'évolution d'une infection est considérée comme une complexité de nombreuses réactions pouvant être comparées à celles qui se

produisent dans un tube à essai. Le facteur psychique n'étant pas démontré, on n'en tient aucun compte dans le laboratoire, et les chercheurs ne le prennent pas en considération dans leurs expériences.

Jusqu'à présent, on ne connaissait pas la méthode à employer pour pouvoir étudier expérimentalement le rôle que joue le système nerveux dans diverses affections et l'influence qu'il peut avoir sur l'immunité.

Les observations empiriques des praticiens n'ont qu'une valeur très relative dans l'étude d'un problème aussi complexe. Cependant, il nous semble que les travaux de S. Métalnikov, qui a pu appliquer la formation des réflexes conditionnels à l'étude de l'immunité, ouvrent une voie nouvelle aux expérimentateurs.

On connaît bien les travaux classiques de Pavlov qui associait à une excitation non conditionnelle gustative provoquant une salivation abondante chez le Chien (badigeonnage de la langue avec un acide) une autre excitation telle que, par exemple, un son ou un éclairage déterminés. En répétant à plusieurs reprises ces deux excitations combinées, Pavlov a pu arriver à faire se produire la salivation, chez un chien, après une seule excitation externe qui, par elle-même, ne pouvait pas la provoquer. C'est ainsi qu'en déclenchant chez le Chien de nouveaux réflexes conditionnels il a pu démontrer l'influence du système nerveux central sur la sécrétion des diverses glandes.

En 1926, S. Métalnikov, en collaboration avec Chorine, a effectué ses premières expériences en appliquant les réflexes conditionnels de Pavlov dans le domaine de l'immunité (1). Ces expériences ont été faites sur des cobayes et des lapins.

« En associant à une excitation interne (injections de microbes chauffés ou de bouillon dans le péritoine) une excitation externe (grattage ou chauffage, vingt à trente fois, d'une même région de la peau), Métalnikov a pu facilement provoquer chez les cobayes des réflexes conditionnels typiques. »

(1) MÉTALNIKOV et CHORINE. Rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité. Ces *Annales*, 40, 1926, p. 893.

« Les cobayes ainsi préparés et ayant subi une excitation externe, donnent les mêmes réactions de défense que s'ils avaient réellement reçu une émulsion de microbes, c'est-à-dire qu'ils présentent la mobilisation des polynucléaires, des monocytes et des lymphocytes. Il est vrai que cette réaction est plus passagère que chez l'animal ayant reçu une injection de microbes, mais elle n'en est pas moins démonstrative (2). Ainsi, on peut obtenir des réactions locales dans le péritoine aussi bien que des réactions générales se traduisant par une modification de la formule leucocytaire dans le sang. »

De même, dans une série d'expériences, Métalnikov a pu démontrer l'influence que peuvent avoir les réflexes conditionnels dans la formation des agglutinines (3).

Plusieurs auteurs ont répété et confirmé ces expériences. Nicolau et Antinescu-Dimitriu (4) ont pu observer la leucocytose et la modification de la formule leucocytaire dans l'exsudat péritonéal des lapins sous la seule influence des réflexes conditionnels; ils ont aussi pu constater l'élévation du titre des agglutinines également après une excitation conditionnelle.

Vigodchikoff et Barykina (5) ont étudié la modification de la formule leucocytaire dans l'exsudat péritonéal des cobayes après les excitations conditionnelles.

Des résultats analogues ont été obtenus par Padkopaeff et Saatchian (6), Palletini (7) et Ostrovskaja (8).

Récemment, Malis (9) a pu obtenir chez les lapins des réactions allergiques de la peau sous l'influence des réflexes conditionnels. Il a fait aux lapins tuberculinisés une série d'injections intradermiques de tuberculine, associant ces injections aux excitations conditionnelles (odeur d'ammoniaque).

(2) MÉTALNIKOV. *La Presse Médicale*, n° 38, 1932.

(3) MÉTALNIKOV. Rôle du système nerveux et des facteurs biologiques et psychiques dans l'immunité. *Monogr. de l'Inst. Pasteur*, Paris, 1934.

(4) NICOLAU et ANTINESCU-DIMITRIU. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 1929, p. 133-135.

(5) VIGODCHIKOFF et BARYKINA. *Journ. Biol. et Med. Exp.*, **4**, 1927 (en russe).

(6) PODKOPAEFF et SAATCHIAN. *Journ. Biol. et Med. Exp.*, **11**, 1929.

(7) PALLETINI. *Soc. Intern. Microb. Boll. Sez. Ital.*, **1**, 1929.

(8) OSTROVSKAJA. *Ces Annales*, **44**, 1930, p. 340.

(9) MALIS. *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 1220.

A la vingt-sixième reprise, il injecta, dans les mêmes conditions, à deux lapins, une solution physiologique au lieu de tuberculine. On observa chez ces deux animaux une rougeur spécifique qui ne différait pas de celle produite par la réaction à la tuberculine chez les mêmes animaux. Puis, l'expérience fut continuée jusqu'à la cinquante-troisième injection à raison d'une injection par jour. La solution physiologique fut substituée à la tuberculine aux trente-quatrième, trente-neuvième, quarante-neuvième, cinquantième, cinquante et unième, cinquante-deuxième et cinquante-troisième injections. Dans ces cas, la rougeur de la peau atteignait une surface de 0 cent. 9  $\times$  1 cent. 2, jusqu'à 1 cent. 6  $\times$  1 cent. 3. On n'observa aucune réaction cutanée chez les lapins témoins tuberculinisés qui avaient reçu la même solution physiologique.

D'après les travaux de Pavlov, on sait que les réflexes conditionnels déjà formés peuvent être inhibés par un nouvel excitant. Des expériences analogues ont été faites par Schambouroff et Belikowa (10) qui ont pu obtenir une leucocytose chez les lapins, sous l'influence de diverses excitations conditionnelles (bruit d'une sonnette, grattage du dos et de l'oreille) aussi bien que l'inhibition des mêmes réflexes en ajoutant aux excitants conditionnels une autre excitation telle que, par exemple, une forte odeur de camphre ou d'ammoniaque.

Ainsi, les lapins, après avoir reçu une série d'injections de vaccin cholérique, associées avec des excitations déterminées, présentaient à la suite des seules excitations, sans injections, une leucocytose marquée. Mais si l'on ajoutait à ces excitations un facteur nouveau, par exemple une odeur de camphre ou d'ammoniaque, la leucocytose ne se produisait pas.

Diacono (11) a étudié le rôle des réflexes conditionnels dans la formation des hémolysines. Ses expériences l'ont amené à conclure que « sans nouvelle incitation antigénique et par le seul effet d'une excitation conditionnelle, la chute graduelle du

(10) Ces *Annales*, **56**, 1936, p. 700.

(11) *L'hémolyse*, Maloine, édit., Paris, 1934.



pouvoir hémolytique d'un sérum de cobaye anti-mouton est suivi d'une récupération d'anticorps hémolytiques se chiffrant sensiblement par la moitié des anticorps perdus ».

Nous avons repris ces expériences et confirmé ces résultats. Depuis notre première publication (12), nous avons pu continuer et compléter nos recherches dont nous exposons ici les résultats; mais auparavant, nous voulons mentionner les objections qui ont été faites au sujet de l'application des réflexes conditionnels à l'étude de l'immunité.

Ces objections peuvent être divisées en deux groupes. Premièrement celles émises par Friedberger et Gurwitz (13) : les expériences de ces auteurs, sur la formation des agglutinines sous l'influence des réflexes conditionnels, ont donné des résultats positifs non seulement chez les animaux en expérience, mais aussi chez un certain nombre de ceux qui servaient de contrôle. Or, tout en constatant ces résultats, ces savants cherchent à exclure le facteur individuel en établissant une moyenne arithmétique, ce qui fait qu'ils arrivent à des résultats très peu démonstratifs.

Le second groupe d'objections comprend celles de Kopeloff (14) et de ses collaborateurs qui n'ont pu obtenir aucune variation du titre des agglutinines chez des lapins ayant subi des excitations conditionnelles.

Notons que les résultats obtenus par Friedberger et ceux obtenus par Kopeloff sont en contradiction les uns avec les autres; ces deux groupes d'objections s'excluent réciproquement et nous voulons indiquer ici les causes d'erreur possibles dans ces expériences.

Pavlov (15), avec ses élèves, a élaboré et mis au point une technique sans laquelle, à l'heure actuelle, l'étude des réflexes conditionnels est devenue impossible. Il insiste tout d'abord sur le choix de l'animal qui servira à ses expériences et il conseille le Chien comme donnant les meilleurs résultats. Mais il

(12) ZERNOFF. *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 1329.

(13) FRIEDBERGER et GURWITZ. *Zeitchs. f. Immunit.*, **72**, 1931.

(14) KOPELOFF (L.), KOPELOFF (N.) et POSSELET. *Journ. of Immunol.*, **29**, 1935, p. 359.

(15) PAVLOV. *Vingt ans d'étude objective de l'activité nerveuse supérieure des animaux*, 1923 (en russe).

ne suffit pas de prendre n'importe quel chien ; un examen préalable est indispensable car les animaux trop vieux ou trop jeunes, malades ou amaigris, ou somnolents, doivent être rejetés. De même, les chiens élevés dans des cages ou dans le laboratoire ne manifestent pas aussi bien les réflexes conditionnels que ceux qui sont élevés en liberté. Enfin, le caractère individuel et l'intelligence de chaque animal joue aussi un rôle important dans ces expériences.

Dans ses travaux, Pavlov insiste également sur l'importance des conditions dans lesquelles sont effectuées les expériences. Ainsi, le laboratoire où se font les excitations conditionnelles doit être situé à l'abri de tout bruit extérieur, l'éclairage doit être toujours le même et l'on ne doit pas oublier qu'un changement de température ou une odeur quelconque peuvent nuire au succès de l'expérience.

Dans les laboratoires de Pavlov, afin d'éliminer tout facteur pouvant contrarier les résultats envisagés, l'expérience se fait dans des chambres spécialement isolées, l'animal est fixé et l'expérimentateur lui-même se trouve caché par un paravent. Toutes les excitations doivent être faites dans des conditions strictement identiques de manière qu'aucun facteur complémentaire ou personnel n'intervienne dans l'expérience.

Dans les recherches faites dans un laboratoire de bactériologie, il est difficile de suivre toutes les indications décrites par Pavlov. Nous expliquons l'insuccès de certains auteurs par une déviation à ces règles élaborées pendant de longues années d'étude spéciale.

Il nous semble que les expériences avec des réflexes conditionnels ne peuvent réussir si un grand nombre d'animaux sont employés à la fois sans que l'on tienne compte de l'individualité de chacun d'entre eux. De plus, les expériences ne doivent pas être faites sur des sujets malades. Suivant Pavlov, des excitations trop fortes ne provoquent jamais la formation de réflexes conditionnels ; bien au contraire, elles peuvent inhiber des réflexes déjà formés. L'excitation non conditionnelle doit toujours suivre l'excitation conditionnelle ; si elle la précède, il ne faut pas attendre la formation des réflexes. Toutes ces règles n'ont pas été observées par Kopeloff et ses

collaborateurs. C'est pour cela, croyons-nous, qu'ils n'ont pas pu obtenir de résultats positifs.

Friedberger et Gurwitz n'ayant pas fait un nombre suffisant d'injections (de 12 à 20) avec des excitations, sont tout de même arrivés à produire une certaine augmentation du titre des anticorps après avoir répété les excitations seules. Ces auteurs ont essayé d'éliminer le facteur individuel en appliquant la méthode des moyennes arithmétiques; aussi, sont-ils arrivés à des conclusions contradictoires. On ne doit pas négliger le facteur individuel là où justement l'individualité joue un rôle si important.

Nous ne doutons pas que, dans toutes ces expériences, on aurait pu obtenir des résultats beaucoup plus démonstratifs en observant les règles décrites par Pavlov et son école, règles élaborées au cours de trente-cinq ans de recherches sur les réflexes conditionnels.

Dans nos expériences personnelles, nous avons tâché d'éviter des erreurs grossières de technique, il faut avouer cependant qu'en de nombreux points notre technique a été très imparfaite, et nous espérons qu'en améliorant les conditions de nos expériences nous pourrions arriver à des résultats beaucoup plus concluants.

Par exemple, nous n'avons pas fait nos expériences sur des chiens (qui sont sans doute les animaux de choix à employer pour l'étude des réflexes conditionnels), mais nous les avons effectuées sur des lapins et des cobayes.

Nous désirons insister encore une fois sur le fait qu'il faut, pour ce genre d'étude, examiner séparément les résultats et les conditions de chaque expérience. Ce n'est qu'en individualisant chacun d'elles qu'il est possible d'arriver à des conclusions déterminées. Si, dans les recherches de Pavlov sur des réflexes conditionnels avec des glandes salivaires, on voulait tracer une moyenne de tous les résultats obtenus sans tenir compte des caractères individuels de chaque animal et des conditions dans lesquelles chaque expérience a été effectuée, on arriverait peut-être à des conclusions très peu démonstratives.

Nous exposons maintenant les résultats de nos travaux poursuivis pendant deux ans sur 44 animaux.

La méthode employée par nous a été la suivante :

Des cobayes neufs ont reçu une série d'injections de globules rouges de mouton, chaque injection ayant été précédée d'une excitation conditionnelle (grattage d'une oreille). Dans les différentes expériences, nous avons fait varier le nombre des injections, la quantité et la concentration de l'émulsion globulaire, la durée de l'excitation et le lieu où nous avons opéré. Nous avons également essayé de faire des injections sous-cutanées et intra-péritonéales.

Après avoir fait une série d'injections aux animaux, nous

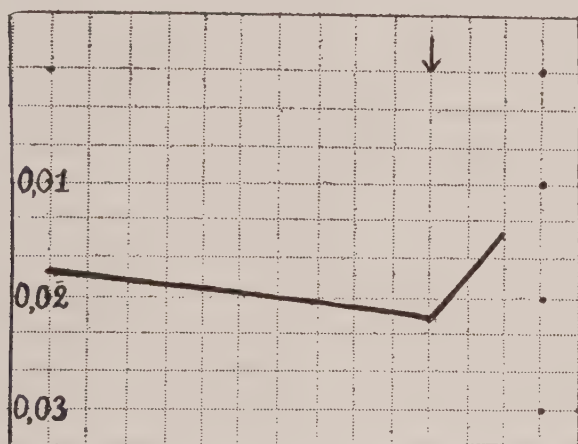


FIG. 4. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sang du cobaye D. 20. La flèche représente les excitations conditionnelles. En ordonnée : titre des hémolysines; en abscisse : temps écoulé après la fin des injections préparantes.

leur avons pris du sang dont nous avons titré le pouvoir hémolytique (16), puis les cobayes ont été laissés au repos pendant vingt à quarante jours après quoi il a été procédé de nouveau à une prise de sang dont on fait le titrage.

(16) Nous inactivons le sérum par chauffage à 56° pendant 30 minutes; puis nous pratiquons le titrage de son pouvoir hémolytique en ajoutant dans chaque tube avec du sérum une quantité fixe d'alexine et 1 cent. cube d'émulsion au vingtième d'hématies lavées de mouton.

Nous portons à l'étuve à 37° pendant une demi-heure. Après ce délai on note les résultats en marquant les tubes où l'hémolyse est totale.

Le même jour, ou le lendemain, nous avons commencé une série d'excitations conditionnelles (grattage de l'oreille) qui ont été faites dans des conditions absolument identiques à celles qui avaient été observées dans la série d'injections faite précédemment, mais cette fois sans introduire d'antigène. Nous avons fait des séries de 3 à 10 excitations quotidiennes

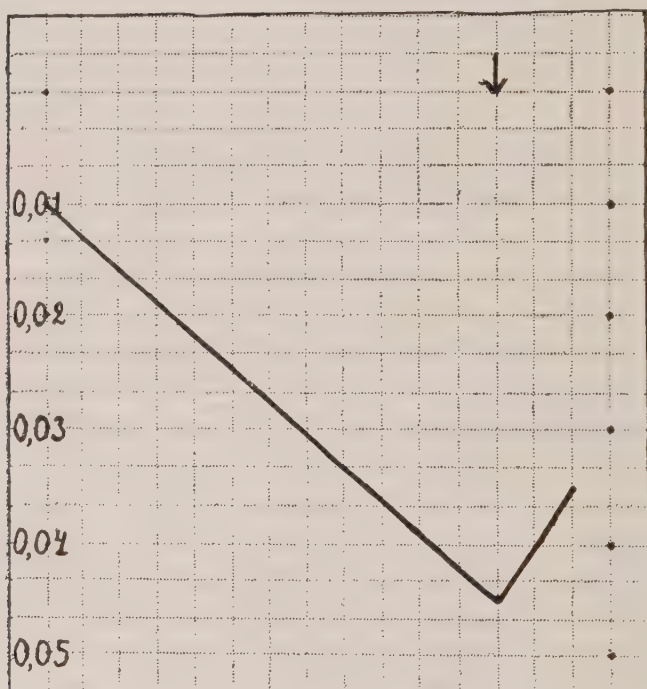


FIG. 2. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sang du cobaye D 21. Augmentation du titre après les excitations conditionnelles qui sont représentées par la flèche.

ou bi-quotidiennes en trois à huit jours. Puis nous avons pris de nouveau un échantillon du sérum des animaux et procédé au titrage de son pouvoir hémolytique.

On obtint ainsi les résultats donnés par trois titrages des anticorps : le premier effectué à la fin d'une série d'injection d'antigène, le deuxième un mois après, et le troisième quelques jours plus tard après une série d'excitations condition-



nelles. On aurait pu supposer que le titre allait descendre graduellement. Il augmente, au contraire, entre le deuxième et le troisième titrage sous l'influence des seules excitations conditionnelles. Cette augmentation doit donc être considérée comme une preuve de la formation des réflexes conditionnels.

Pour éviter de nombreuses causes d'erreur, nous avons toujours conservé à la glacière une partie du sérum inactivé, pris avant les excitations conditionnelles, et nous l'avons titré en même temps que le sérum recueilli après les excitations. Ainsi, nous avons éliminé l'influence que peuvent avoir sur le résultat donné par le titrage des anticorps l'alexine, l'émulsion des globules rouges de mouton, les variations de la température, etc...

Comme nous

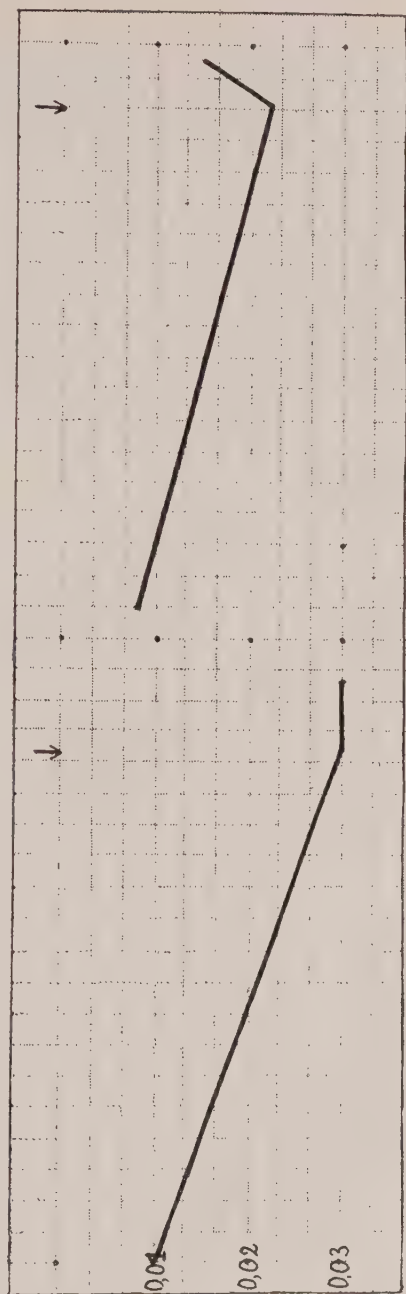


FIG. 3. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sang du cobaye D. 15.  
En A, après la première série d'injections ; en B, après la deuxième série d'injections.

l'avons dit, les expériences ont été faites sur 44 animaux : 38 cobayes et 6 lapins. Les lapins ont été employés à titre d'essai, mais les cobayes ayant donné de meilleurs résultats, nous avons continué à nous en servir dans la suite.

Nous avons pu suivre chaque animal pendant un temps assez long (jusqu'à un et deux ans), ce qui nous permit de faire plusieurs expériences sur chacun d'eux.

Sur les 38 cobayes employés, 17 nous ont servi pour expé-

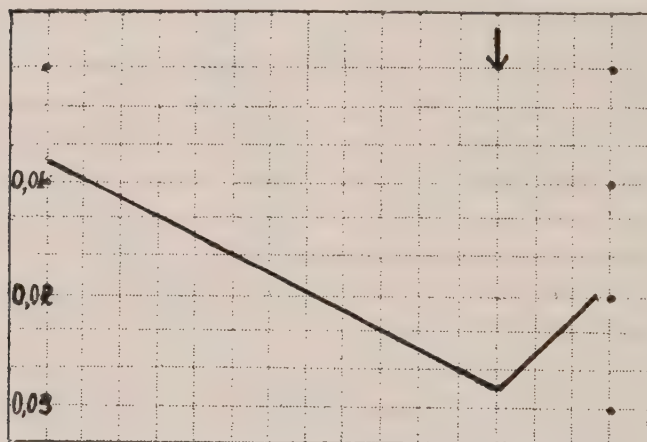


FIG. 4. — Courbe représentant l'augmentation du titre des hémolysines après les excitations conditionnelles. Le cobaye a reçu 3 séries de 53 injections préparantes.

rimer les réflexes conditionnels et 21 autres ont servi de témoins.

En général, pour produire les réflexes conditionnels, nous avons fait des injections quotidiennes de 0 c. c. 5 à 1 cent. cube de purée globulaire diluée à 50 p. 100 dans l'eau physiologique.

Chez les témoins 3 à 5 injections de plusieurs cent. cubes espacées de quelques jours suffisaient pour produire un sérum hémolytique de titre équivalent. Pour obtenir de bons animaux de contrôle, il est essentiel d'éviter de leur faire de nombreuses injections quotidiennes, car la répétition des mêmes manipulations peut provoquer la formation d'un réflexe conditionnel déterminé. C'est ce qui s'est produit dans l'expérience de

Kryloff (17) qui, après avoir fait à un chien une série d'injections de morphine, a obtenu tous les symptômes d'une intoxication morphinique, et cela même après la simple introduction de l'aiguille sous la peau.

Il faut noter une mortalité élevée chez nos animaux de contrôle, fait qui peut être expliqué par les réactions anaphylactiques présentées par nos cobayes. C'est surtout parmi ces derniers que nous avons observé des indurations et même des escarres aux points d'injection. C'est ainsi que parmi les 21 cobayes témoins, 9 ont succombé avant le soixantième jour

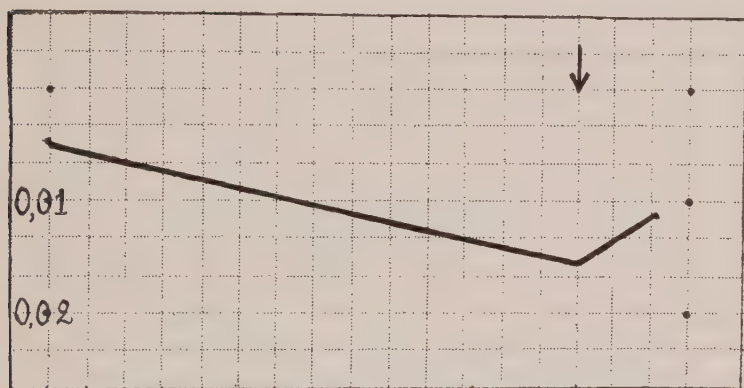


FIG. 5. — Courbe représentant l'augmentation du titre des hémolysines après les excitations conditionnelles. Le cobaye a reçu 3 séries de 61 injections préparantes.

qui a suivi la première injection d'antigène. Le plus souvent la mort est survenue entre le quarantième et le cinquantième jour.

Des 17 cobayes qui avaient reçu des séries d'injections quotidiennes, 2 seulement sont morts avant le soixantième jour. Nos expériences ont donc été poursuivies avec 15 cobayes. De ces 15 cobayes, 6 ont présenté une augmentation marquée du titre des hémolysines sous l'influence des excitations conditionnelles faites après la première série d'injections, chaque série comprenant de 14 à 40 injections associées aux excitations conditionnelles.

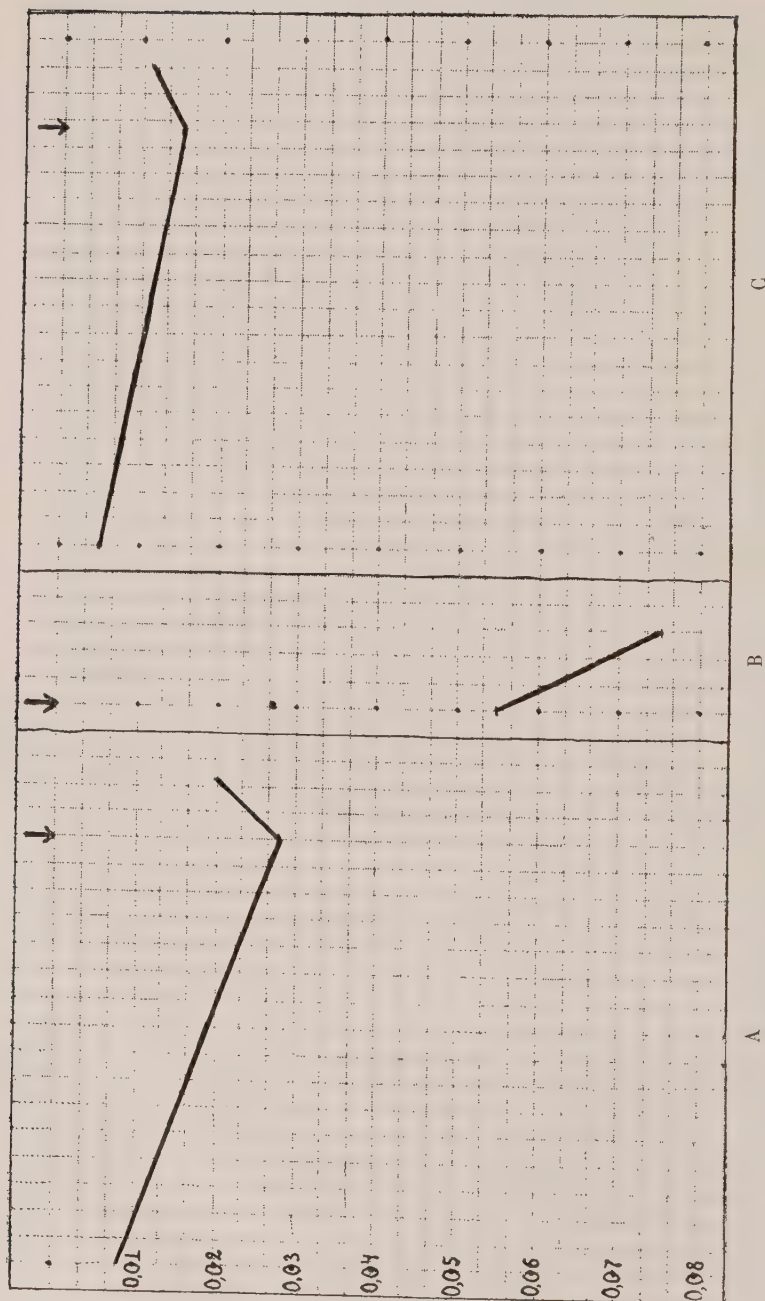


FIG. 6. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sang du cobaye D 20. En A, après la première série d'injections; en B, après un repos de cinq mois; en C, après une nouvelle série d'injections.

Nous donnons à titre d'exemple deux courbes représentant les résultats de deux de ces expériences (fig. 1 et 2).

Mais il est arrivé souvent qu'une seule série d'injections ne suffisait pas. Chez deux cobayes, par exemple, il a fallu deux

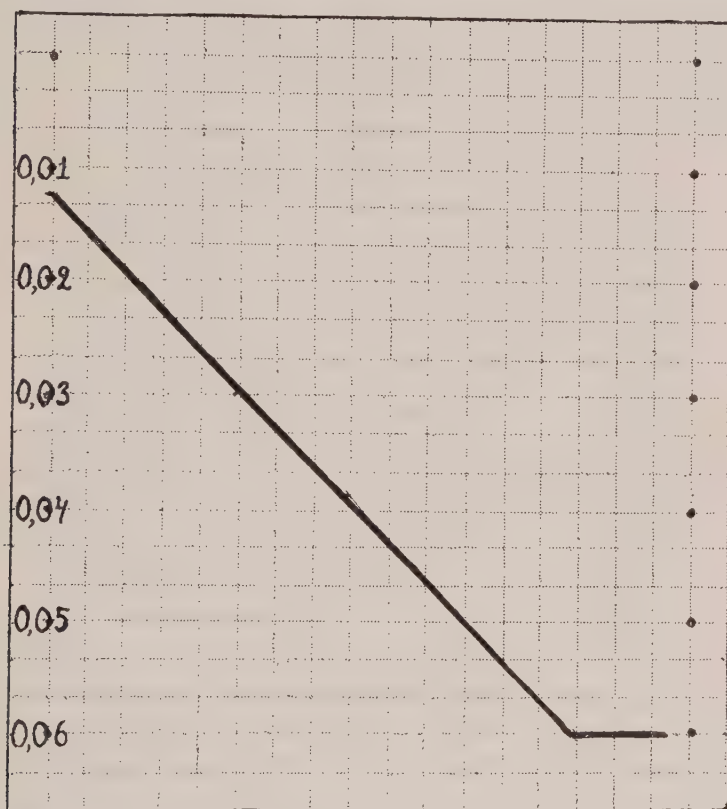


FIG. 7. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sérum du cobaye de contrôle.

séries donnant un total de 53 et 55 injections pour obtenir la formation des réflexes conditionnels (voir fig. 3).

Chez deux autres cobayes, les réflexes conditionnels n'ont été formés qu'après la troisième série d'injections seulement (le nombre total fut de 58 et 61 injections) [voir fig. 4 et 5].

Comme on le voit, la formation des réflexes conditionnels nécessite un certain nombre d'injections associées aux exci-



tations, et ce nombre peut varier de 14 à 60. D'autre part, les réflexes déjà formés peuvent disparaître; pour les obtenir de nouveau, il suffit souvent de quelques injections de rappel. Ainsi, dans l'expérience n° XX, le cobaye D 20 a donné une augmentation du titre des anticorps sous l'influence des excitations conditionnelles faites trente-quatre jours après une première série de 35 injections. Six mois plus tard, il n'a pas

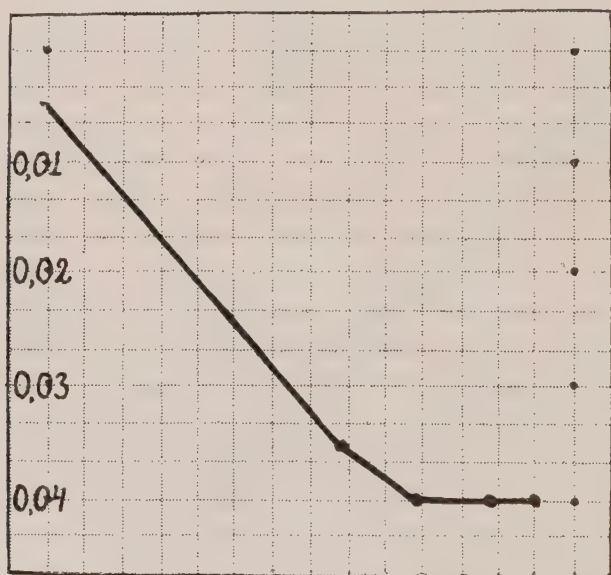


FIG. 8. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines chez le cobaye D 43. 4 prises du sang successives.

réagi aux mêmes excitations. Il fallut refaire encore 23 injections associées aux excitations pour obtenir de nouveau une réaction sous l'influence des réflexes (voir fig. 6).

Ainsi, dans nos expériences, 10 animaux sur 15 ont donné des résultats nettement positifs.

Il nous paraît intéressant de rechercher les raisons des insuccès. Ainsi, le sérum du cobaye D 29 (Exp. XXXIV) montra un titre d'hémolyse très faible. Un mois après la première série de 20 injections, ce titre fut de 0,04. Nous avons voulu le renforcer et nous avons fait de nouveau une série de 29 in-

jections; cette fois encore, après un mois de repos, le titre descendit jusqu'à 0,07. Après deux mois de repos, nous avons fait une troisième série de 10 injections, et cette fois le sérum du cobaye donna un titre de 0,02, lequel était encore de beaucoup inférieur à celui donné par le sérum d'autres animaux ayant reçu une seule série d'injections.

Donc, les excitations conditionnelles faites un mois après chaque série d'injections n'ont pas influencé le titre des hémolysines. Il est évident que c'est une anomalie dans la

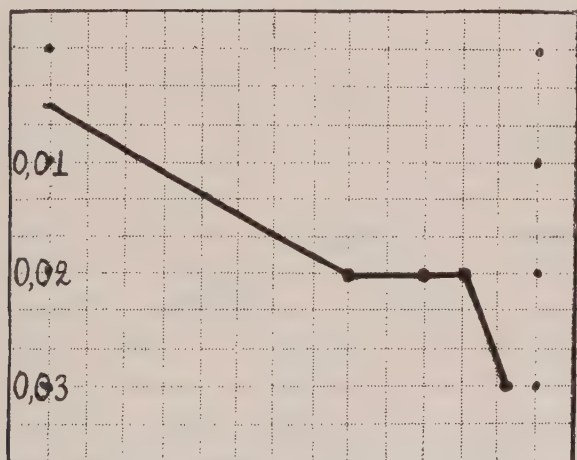


FIG. 9. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines chez le cobaye D 41. 4 prises du sang successives.

production des anticorps qui est la raison de l'insuccès de cette expérience.

Dans l'expérience n° XXXIII sur le cobaye D 97, nous n'avons fait qu'une seule série de 20 injections. Le titre des hémolysines n'est pas remonté après les excitations conditionnelles, mais nous n'avons pas pu continuer notre expérience à cause de la mort de l'animal. Ici, le nombre d'injections se montra insuffisant.

Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas obtenu de résultat positif dans l'expérience VII : le cobaye D 12 a reçu une série de 15 injections ; un mois après on a fait 10 excitations conditionnelles, mais le titre des anticorps, avant et

après ces excitations, est resté le même. A la suite d'un repos de trois mois, le cobaye a reçu encore une série de 11 injections. Quarante et un jours après, il n'a pas encore réagi aux excitations conditionnelles. L'expérience a été interrompue pour cause de mort de l'animal.

Il est cependant intéressant de noter qu'un autre cobaye, C 44, ayant subi un traitement identique, n'a pas réagi aux excitations après les deux premières séries d'injections ; mais

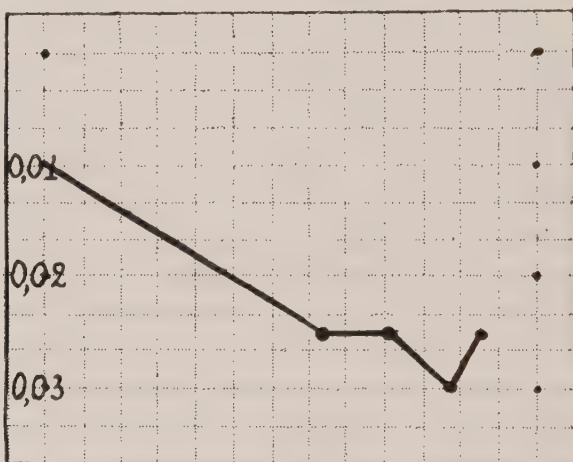


FIG. 10. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sang du cobaye D. 37. 4 prises du sang successives.

après la troisième série de 35 injections, nous avons pu obtenir une augmentation nette des anticorps sous l'influence des réflexes conditionnels (voir fig. 5).

Enfin, chez deux autres cobayes qui n'ont pas donné de résultats positifs après une série de 35 injections, nous avons observé une chute de leur poids. Le cobaye D 10 (Exp. V) a perdu, en une semaine, 80 grammes et le cobaye D 7 (Exp. VI), 70 grammes. Cela ne pourrait-il pas expliquer ces résultats négatifs ?

Il faut noter que dans les expériences avec les réflexes conditionnels, on ne peut pas s'attendre à 100 p. 100 de résultats positifs. Nous avons voulu analyser les raisons de l'insuccès de ces quelques cas, car nous considérons qu'elles peuvent

permettre de comprendre quelles sont les conditions nécessaires à la formation des réflexes conditionnels.

Comme nous l'avons déjà dit, nous avons fait un contrôle spécial sur les cobayes témoins. Sur les 4 cobayes qui ont reçu quelques injections espacées de globules rouges de mouton sans accompagnement d'excitations conditionnelles, nous avons fait 6 expériences et nous avons obtenu, après des séries de frottements de l'oreille faites pendant quatre à six

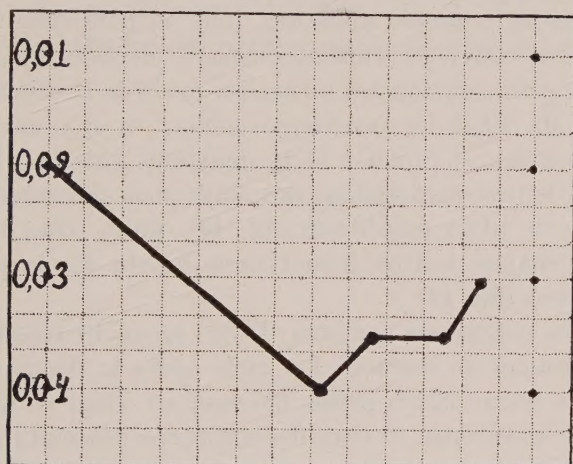


FIG. 41. — Courbe représentant les variations du titre des hémolysines du sang du cobaye D 42. 4 prises du sang successives.

jours, un titre des hémolysines égal ou bien inférieur à celui qui avait été obtenu avant ces frottements.

Un autre cobaye de contrôle a reçu 20 injections quotidiennes de globules rouges de mouton sans les associer à des excitations conditionnelles quelconques. De plus, ces injections ont été faites à l'écurie même, pour ne pas former un réflexe conditionnel à la suite du transport au laboratoire ou de la vue des préparatifs précédant les injections.

Les prises de sang et le titrage du pouvoir hémolytique de celui-ci ont été faits le lendemain de la dernière injection, quarante et un jours plus tard, et encore cinq jours après. Les résultats obtenus par le titrage montrent un abaissement du



titre après la première prise de sang; il n'est pas remonté après la deuxième (voir fig. 7).

D'autre part, nous avons voulu étudier quelle influence sur la variation du titre hémolytique du sérum exercent de nombreuses prises de sang successives. Dans ce but, chez 6 cobayes du contrôle ayant reçu 4 injections de globules rouges de mouton, nous avons fait, un mois après la dernière injection, 4 prises de sang en dix jours.

Deux cobayes ont montré un abaissement du titre hémolytique après la première ponction, puis ce titre resta stationnaire (fig. 8). Chez un troisième cobaye, il resta d'abord stationnaire, puis commença à s'abaisser après la troisième ponction (fig. 9). Chez un quatrième cobaye, il n'y eut pas de différence entre le premier et le deuxième titrages, mais au troisième, le titre hémolytique descendit pour remonter ensuite au niveau de titres précédents (fig. 10). Enfin, chez les deux derniers cobayes, le titre hémolytique monta dès la première prise de sang (fig. 11).

Un autre cobaye de contrôle, D 31, reçut 10 injections de globules rouges de mouton. Un mois après la dernière injection, nous avons fait 5 prises de sang en vingt et un jours. Jusqu'à la quatrième, le titre des anticorps descendit graduellement. Puis, à la cinquième prise, il remonta de nouveau.

Ces dernières expériences montrent que de nombreuses prises de sang, répétées en un délai de temps assez court, peuvent, dans certains cas, influencer la production des hémolysines dans le sérum des cobayes. Sur 7 cobayes chez qui nous avons pratiqué 4 à 5 prises de sang successives, 3 ont donné une augmentation du titre hémolytique. Il est important de distinguer ces variations de l'augmentation du titre des anticorps provoquée sous l'influence des réflexes conditionnels.

Pour ces raisons, dans l'étude sur la production des anticorps à la suite des réflexes conditionnels, il faut éviter de faire de nombreuses prises de sang dans un délai de temps trop court.

En résumé, tout en confirmant la théorie de S. Métalnikov, nous avons pu prouver une fois de plus la possibilité de produire des hémolysines sous l'influence des réflexes condition-



nels. Ainsi, nous avons obtenu une augmentation du titre hémolytique du sang sans injections d'antigène chez 10 cobayes sur 15.

De 14 à 60 injections d'antigène associées aux excitations conditionnelles sont nécessaires pour la formation des réflexes conditionnels chez les cobayes.

Sur 10 cobayes qui ont présenté une augmentation du titre hémolytique sous l'influence des réflexes conditionnels, 6 ont formé ces réflexes après la première série d'injections d'antigène, 2 après la seconde et 2 après la troisième.

Les 5 cobayes témoins n'ont pas présenté d'augmentation du titre des hémolysines après la seconde prise de sang.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

